

بررسی میزان بیان ژن پمپ افلاکس *norB* در سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم در برابر سیپروفلوکساسین

سلمان اسدی پیرزاده، مهدی ابراهیمی، محمد ابراهیم زاده

واکنش گل مریم (*Polianthes tuberosa* L.) به کاربرد برخی از ویتامین‌ها

مهرداد باباربیع، حسین زارعی

تأثیر خون مهره‌داران مختلف روی پارامترهای تولیدمثلی زالوی شرقی *Hirudo orientalis*^۱

داریوش بزرگی،* حسین رحمانی، سهراب کوهستان اسکندری، خسرو جانی خلیلی
ردیابی مولکولی خاویار استحصال شده از گونه‌های تاسماهیان برای تشخیص خاویار اصل و تشخیص نوع گونه خاویار

شیرین جمشیدی، محمد حسن زاده صابر، مریم منصف شکری

مقایسه دو روش ریخت سنجی سنتی و ریخت سنجی هندسی برای تفکیک گونه‌های جنس *Peters*, (Perciformes: Sparidae)

Acanthopagrus 1855 در خلیج فارس و خلیج عمان

بی‌تا دهقانی، فائزه یزدانی مقدم، مسطوره دوستدار، سید احمد رضا هاشمی، احسان دامادی

ترکیب رژیم غذایی و ترجیحات غذایی وزغ (*Bufotes sitibundus* (Amphibia: Anura: Bufonidae) ساکن غار در
غرب ایران

حمید درویش نیا، امیر ارسلان کاویانی فرد

ارزیابی تأثیر فاکتور رشد Activin A و کوچک مولکول IDE1 در تکثیر و خودنوزایی سلول‌های زایای بدوی جوجه در
شرایط کشت آزمایشگاهی

معصومه زارع، سیدضیال‌الدین میرحسینی، سیده نفیسه حسینی، شاهرخ قوتی

تأثیر محلول پاشی نانوذره تیتانیوم و روی بر کاهش اثرات تنش شوری در گیاه بابونه

ایرج عزتمند، لمیا وجودی مهربانی، علی عبدالزاده فرد

اثرات تغییر اقلیم بر الگوی پراکنش و مطلوبیت زیستگاه سوسمار آذربایجانی *Darevskia r. raddei* (Boettger,

1892) (سوسماران: لاسرتیده)

رسول کرمیانی، امیر دهقانی

بررسی اثر غلظت مواد شیمیایی و محدودیت ۵۰ درصدی در آب آشامیدنی بر عملکرد تولیدی، کیفیت تخم‌مرغ و شاخص-
های بیوشیمیایی و هماتولوژی خون مرغان تخم‌گذار

حسین نورنیا، رضا وکیلی، سعید سبحانی راد، مهدی الهی ترشیزی

بسم الله الرحمن الرحيم

مجله زیست شناسی کاربردی

پاییز ۱۴۰۲

صاحب امتیاز: معاونت پژوهشی دانشگاه الزهرا (س)

مدیر مسئول: دکتر مهوش سیفعلی ، استادیار دانشگاه الزهرا (س)

سر دبیر: دکتر محمد رضا صعودی، استاد دانشگاه الزهرا (س)

اعضای هیأت تحریریه:

دکتر مهناز اقدسی، دانشیار دانشگاه گرگان

دکتر حمید اجتهادی، استاد دانشگاه فردوسی مشهد

دکتر نرگس حسینمردی، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی

دکتر فرشاد درویشی، استاد دانشگاه الزهرا (س)

دکتر مرجان سیدی، دانشیار دانشگاه تهران

دکتر مسعود رنجبر، استاد دانشگاه بوعلی سینا

دکتر عذرا صبور، دانشیار دانشگاه الزهرا (س)

دکتر احیا عبدی عالی، دانشیار دانشگاه الزهرا (س)

دکتر پریناز قدم، دانشیار دانشگاه الزهرا (س)

دکتر زرین مینوچهر، دانشیار دانشگاه تهران

دکتر تورج ولی نسب پوری، استاد پژوهشی موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور

مدیر اجرایی: شهربانو برجیان

ناشر: معاونت پژوهشی دانشگاه الزهرا (س)

ویراستار: خانم معصومه اصلان زاده

چاپ و صحافی: انتشارات

ترتیب و انتشار: فصلنامه

شمارگان: ۱۰ نسخه

بها: ۱۰۰۰۰ ریال

این فصلنامه علمی – پژوهشی با مجوز شماره ۵۲۴۷۴ / ۸۹/۳/۱۱ – در تاریخ ۸۹/۹/۸ منتشر می گردد.

فصلنامه علمی – پژوهشی زیست شناسی کاربردی با همکاری انجمن زیست شناسی ایران منتشر می شود .

این مجله در پایگاه استنادی علوم جهان اسلام نمایه می شود : www.Isc.gov.ir

نشانی: تهران، ونک، ده ونک، دانشگاه الزهرا (س) معاونت پژوهشی، کدپستی ۱۹۹۳۸۹۱۱۷۶. تلفن و نمابر: ۸۵۶۹۲۲۰۵

شاپا: ۹۸۸۴-۱۶۰۷

Website: <http://journals.alzahra.ac.ir/jab> Email: Japplbiol@alzahra.ac.ir

بر اساس دو معیار کلیدی در دست اصلاح و نوسازی است: **JAB** نویسندگان گرامی، محتوای راهنمای

(۱) افزایش رؤیت‌پذیری و بین‌المللی شدن نشریه، (۲) آسان سازی راهنمای نویسندگان. لذا برای ارسال مقالات از آخرین نسخه دستورالعمل‌ها روی سایت نشریه استفاده بفرمایید

این نشریه پژوهش‌هایی که رویکرد آن‌ها کاربرد در یکی از زمینه‌های گوناگون زیست‌شناسی باشد را برای: دامنه نشریه داوری و نشر می‌پذیرد. رویکردهای کاربردی در زیست‌شناسی محاسباتی، بیوفیزیک، بیوشیمی، ژنتیک، بیوانفورماتیک، زیست‌شناسی سامانه‌ها، زیست‌شناسی مصنوعی و کاربردهای مرتبط با فاژها، ویروس‌ها، باکتری‌ها، آرکی‌ها، تک‌یاختگان یوکاریوتی، ریز جلبک‌ها، شاخه‌های گوناگون گیاهان و جانوران مورد توجه نشریه هستند

نشریه مقالات مستخرج از پژوهشی‌های میدانی و آزمایشگاهی را می‌پذیرد. این نشریه مقالات مروری (حداکثر: نوع مقالات یک مقاله مروری در هر شماره) را از پژوهشگران صاحب‌نظر که دارای مقالات متعدد پژوهشی در آن موضوع باشند، برای داوری و نشر می‌پذیرد

نویسندگان مسئول یا عهده‌دار مکاتبات (مربی پژوهشی، استادیار، دانشیار، استاد، دکترای تخصصی: عهده‌دار مکاتبات باید دارای وابستگی به مراکز معتبر علمی کشور (دانشگاهها، پژوهشگاهها و مراکز تحقیق و توسعه مؤسسات) - (PhD) باشند. (نشریه تعهدی نسبت به پذیرش مقالات ارسالی دانشجویان ندارد

زبان انتشار مقالات فارسی و انگلیسی است. مقالات متشکل از یک مقاله کامل فارسی با چکیده انگلیسی و: زبان نشریه است. همچنین نشریه مقالات پژوهشی و (EEA: Extended English Abstract) نیز چکیده مبسوط انگلیسی مروری کامل انگلیسی را پس از داوری و پذیرش در شماره ویژه منتشر می‌کند

را توصیه اکید می‌شود نویسندگان راهنمای نگارش مقاله فارسی، و نیز راهنمای چکیده مبسوط انگلیسی: راهنمای نگارش مطالعه بفرمایند

و نیز الگوی چکیده مبسوط انگلیسی الگوی مقاله فارسی نشریه با (template) قالب نگارش: الگوی نگارش در دسترس است (extended abstract)

مدت انتظار پیش‌بینی شده برای داوری و دریافت پذیرش ۲ ماه است و بنابر تشخیص سردبیر امکان ارسال دوباره: مدت انتظار پیوست است بدون نیاز به پرداخت مجدد وجود دارد. مراحل خلاصه شده فرایند و زمان بندی رسیدگی (resubmit)

متعهد است. تعهد نویسندگان به اصول اخلاق پژوهش برای نشریه COPE نشریه نسبت به اصول اخلاق نشر: تعهدات اخلاقی و نیز اعلام یک اصل است و دریافت کد اخلاق به همه نویسندگان توصیه می‌شود. تکمیل و امضای کاربرگ‌های تعهدنامه ضروری است تعارض منافع

بخشی از هزینه‌های انتشار مقالات بر عهده نویسندگان است مطابق ضوابط پرداخت نویسندگان: هزینه انتشار مقالات

با دفتر تحریریه نشریه با شماره (۰۲۱۸۵۶۹۲۲۰۵) یا پست: تماس با نشریه
تماس بگیرید japblbiol@alzahra.ac.ir الکترونیک

(از نویسندگان، داوران و کاربران محترم تقاضا می‌شود، نقد و نظر خود را به نشانی پست الکترونیک بالا ارسال بفرمایند)

Paper Type: Original Article



Evaluation of norB Gene Expression in Ciprofloxacin Resistant *Staphylococcus aureus* Strains

Salman Asadi Pirzadeh¹, Mehdi Ebrahimi^{2,*}, Mohamad Ebrahimzadeh³

¹ Department of Genetics, College of Biological Sciences, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Pishva, Iran; MSc. Student, salmanasadi2035@gmail.com.

² Department of Biochemistry and Biophysics, College of Biological Sciences, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Pishva, Iran; Assistant Professor, ebrahimi@iauvaramin.ac.ir.

³ Department of Biology, College of Biological Sciences, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Pishva, Iran; Assistant Professor, ebrahimzadeh_md@yahoo.com.

Citation:

Asadi Pirzadeh, S., Ebrahimi, M., & Ebrahimzadeh, M. (2023). Evaluation of norB gene expression in ciprofloxacin resistant *Staphylococcus aureus* strains. *The quarterly scientific journal of applied biology*, 36 (3), 1-10.

Received: 31/10/2022

Accepted: 12/06/2023

Abstract

Introduction: Today, antibiotic resistance to staphylococcal infection has become a major problem in hospitals and the community. This study aims to investigate the norB gene expression level in quinolone-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from clinical samples in Qom City.

Methods: *Staphylococcus aureus* isolates were obtained from different clinical samples using standard biochemical and culture methods. The presence of femA genes as a molecular diagnosis of *Staphylococcus aureus*, norB as a target gene, and rpoD as a reference gene were investigated using the Multiplex PCR technique. The pattern of antibiotic resistance was determined using the standard disk diffusion method, and the minimum inhibitory concentration of the ciprofloxacin antibiotic of the isolated strains was determined using the microdilution method. The expression level of the norB gene was determined using a real-time PCR method.

Results: 82 isolates were obtained from 240 clinical samples using standard biochemical and culture methods. Multiplex PCR technique had shown that genes femA, norB, and rpoD are simultaneously present in 40 isolates (48/78%). Also, after analyzing the antibiotic pattern, 26 strains were resistant to ciprofloxacin. The results of the real-time PCR technique indicated an increase in norB gene expression among ciprofloxacin-resistant strains. According to the obtained results, the norB efflux pump plays an essential role in creating resistance to ciprofloxacin, and investigating the presence of this gene can be important in suggesting a treatment model.

Conclusion: The low diversity and abundance of food items in the cave habitat implies a more intense competition for food in the cave's unique environment with low energy resources. The presence of various-sized prey among the food items indicates an opportunistic feeding habit in this toad, as well.

Keywords: Ciprofloxacin, Efflux pump, Gene norB, Real-time PCR, *Staphylococcus aureus*.





بررسی میزان بیان ژن پمپ افلاکس norB در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم در برابر سیپروفلوکساسین

سلمان اسدی پیرزاده^۱، مهدی ابراهیمی^{۲*}، محمد ابراهیم زاده^۳

^۱گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، پیشوا، ایران.

^۲گروه بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، پیشوا، ایران.

^۳گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، پیشوا، ایران.

چکیده

مقدمه: امروزه مقاومت آنتی‌بیوتیکی عفونت استافیلوکوکی هم در بیمارستان‌ها و هم در محیط جامعه به یک مشکل اساسی تبدیل شده است. هدف از این مطالعه بررسی میزان بیان ژن norB در ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به کینولون جدا شده از نمونه‌های بالینی در شهر قم در سال ۱۳۹۶ است.

روش‌ها: ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس از نمونه‌های مختلف بالینی با روش‌های استاندارد بیوشیمیایی و کشت به دست آمد. در ادامه با استفاده از تکنیک Multiplex PCR حضور ژن‌های femA به عنوان تشخیص مولکولی استافیلوکوکوس اورئوس، norB به عنوان ژن هدف و rpoD به عنوان ژن رفرنس مورد بررسی قرار گرفتند. الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی با استفاده از روش استاندارد دیسک دیفیوژن و حداقل غلظت مهاري آنتی‌بیوتیک سویه‌های جدا شده با روش میکرودایلیوشن تعیین شد. میزان بیان ژن norB با استفاده از روش Real-Time PCR اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: از ۲۴۰ نمونه بالینی جمع‌آوری شده، تعداد ۸۲ سویه استافیلوکوکوس اورئوس با روش‌های استاندارد بیوشیمیایی و کشت جداسازی شد. با بررسی مولکولی، حضور هم‌زمان ژن‌های femA، norB و rpoD در ۴۰ ایزوله (۴۸/۷۸٪) تایید شد. هم‌چنین با بررسی الگوی آنتی‌بیوتیکی تعداد ۲۶ سویه مقاوم به سیپروفلوکساسین شناسایی شدند. نتایج به‌دست‌آمده از تکنیک Real Time PCR نشان‌دهنده افزایش بیان ژن norB در میان سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین بود.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتیجه به‌دست‌آمده پمپ افلاکس norB در ایجاد مقاومت به سیپروفلوکساسین نقش اساسی دارد و بررسی حضور این ژن می‌تواند در پیشنهاد الگوی درمانی حایز اهمیت باشد.

کلیدواژه‌ها: استافیلوکوکوس اورئوس، پمپ افلاکس، ژن norB، سیپروفلوکساسین، Real-Time PCR.

۱- مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس از جمله مهم‌ترین عوامل ایجادکننده عفونت‌های بیمارستانی و اکتسابی در جامعه است [1]–[3]. تخمین زده می‌شود که ۲۰٪ جمعیت انسانی، حاملین طولانی مدت استافیلوکوکوس اورئوس باشند. استافیلوکوکوس‌ها، کوکسی‌های گرم مثبت، بی‌حرکت، دارای کپسول در درون میزبان، فاقد پیلی و فاقد اسپور محسوب می‌شوند. در چرخه به‌صورت تکی، دوتایی، چهارتایی، زنجیره‌های کوتاه و توده‌های نامنظم شبیه

خوشه انگور دیده می‌شوند [4]. استافیلوکوکوس اورئوس به دلیل قدرت بیماری‌زایی بالقوه و مقاومت روزافزون در برابر عوامل ضد باکتریایی به یکی از مشکلات بهداشتی مهم در جهان تبدیل شده است. این باکتری توانایی ایجاد طیف وسیعی از بیماری‌ها را دارد و از طریق تولید انواع سم‌ها، تهاجم مستقیم و تظاهرات بالینی متنوعی را پدید می‌آورد [3-1]. امروزه ایزوله‌های مقاوم به متی‌سیلین استافیلوکوکوس اورئوس (MRSA) به عنوان خطرناک‌ترین سویه‌های بیماری‌زایی تلقی می‌گردند [5]. پمپ‌های افلاکس با انتقال فعال ترکیبات دارویی به خارج از سلول موجب کاهش نفوذپذیری غشا نسبت به ترکیبات دارویی و در نتیجه بروز مقاومت‌های چنددارویی می‌شوند [6]. کینولون‌ها در دهه ۱۹۶۰ از ترکیبات ضد مالاریایی کینین به عنوان یک محصول فرعی به دست آمدند. مشتقات فلوردار کینولون‌ها مانند سیپروفلوکساسین، نوروفلوکساسین و اوفلوکساسین در دهه ۱۹۸۰ معرفی شدند. استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های فوق علیه پاتوژن‌های گرم مثبت مانند ایزوله‌های MRSA می‌تواند منجر به مقاوم شدن آن‌ها در برابر این آنتی‌بیوتیک‌ها شود. در حال حاضر، مقاومت نسبت به کینولون‌ها در ایزوله‌های MRSA را شاید بتوان حدود ۹۰٪ تخمین زد [7، 8].

مقاومت نسبت به کینولون‌ها بر اثر موتاسیون‌های کروموزومی ایجاد می‌شود. علاوه بر این، سیستم‌های افلاکس به‌ویژه پمپ افلاکس NorA و NorB و NorC سبب دفع آنتی‌بیوتیک و کاهش غلظت درون‌سلولی می‌شود که نتیجه آن، کاهش عملکرد ترکیبات دارویی است. از همین رو این پمپ‌ها نقش بسزایی در مقاومت استافیلوکوکوس اورئوس به کینولون‌ها به‌ویژه سیپروفلوکساسین ایفا می‌کنند. این سازمان‌دهی و عملکرد، موجب خارج شدن آنتی‌بیوتیک از میان هردو غشای داخلی و خارجی در باکتری‌ها می‌شود [6، 9، 10]. پمپ‌های خانواده Nor می‌توانند علاوه بر دفع انواع مختلف کینولون‌ها، (مانند نورفلوکساسین و سیپروفلوکساسین که جزء آب دوست‌ها هستند و موکسی فلوکساین و اسپارفلوکساسین جزء آب‌گریزها هستند)، ترکیبات شیمیایی دیگر مانند برومایدبرمید، ستریمید و تترافیل فسفونیوم را نیز دفع کنند [11].

با توجه به این‌که عفونت استافیلوکوکوس اورئوس به‌ویژه سویه‌های MRSA به دلیل فقدان درمان سریع و مناسب، عدم کارایی مناسب و گران بودن داروهای در دسترس، چالش مهمی در کنترل عفونت در بیمارستان‌ها محسوب می‌شود [12]. در این تحقیق فراوانی سویه‌های استافیلوکوک اورئوس مقاوم جدا شده از بیماران نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج به‌ویژه آنتی‌بیوتیک‌های فلوروکینولونی بررسی شده و میزان بیان ژن *norB* به عنوان یکی از ژن‌های دخیل در بروز مقاومت در بین سویه‌های حساس و سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک فلوروکینولونی ارزیابی شد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- جمع‌آوری نمونه‌های مشکوک

جامعه مورد مطالعه، شامل کلیه سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس به‌دست آمده از نمونه‌های بالینی بیماران بستری و هم‌چنین نمونه‌های مشکوک به استافیلوکوکوس اورئوس در آزمایشگاه‌های بیمارستان‌ها و مراکز درمانگاهی سطح شهر قم است. نمونه‌های زخم جراحی با مراجعه به بیمارستان‌های نکویی-هدایتی (بخش جراحی زنان)، علی‌بن‌ابی طالب علیه‌السلام (بخش جراحی) جمع‌آوری گردیدند. هم‌چنین ایزوله‌های مشکوک به استافیلوکوکوس اورئوس از آزمایشگاه‌های بیمارستان‌های نکویی-هدایتی، علی‌بن‌ابی طالب علیه‌السلام، امام رضا علیه‌السلام و درمانگاه امام صادق علیه‌السلام در مدت سه ماه (از شهریور ۹۶ الی آبان ۹۶) به دست آمدند. نمونه‌های بخش‌های بیمارستانی با استفاده از سواب استریل پس از تمیز کردن سطح زخم از بخش‌های عمقی زخم دریافت شد و بلافاصله در لوله‌های حاوی محیط مایع مغز و قلب (BHI) استریل تلقیح شده و ظرف مدت زمان ۴ ساعت تا ۶ ساعت به آزمایشگاه منتقل شد. پس از آن لوله‌ها یک شبانه روز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شده و سپس مقدار یک لوپ از محیط به‌صورت کشت چهارمرحله‌ای بر روی محیط مغز و قلب آگار کشت داده شد. پرگنه‌های به‌دست آمده با آزمایش‌های رنگ‌آمیزی گرم، کاتالاز، کواگولاز لام و لوله‌ای، رشد بر روی مانیتول سالت آگار، رشد بر روی محیط بلاد آگار و آزمایش DNase ارزیابی شدند.

۲-۲- تکثیر ژن‌های *femA*, *norB* و *rpoD* با استفاده از Multiplex PCR

در این مرحله برای شناسایی جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس دارای ژن *norB* از روش Multiplex PCR استفاده شد. در این تکنیک سه ژن *femA*, *norB* و *rpoD* در جدایه‌ها به‌صورت هم‌زمان بررسی شدند. پرایمرهای ژن *femA* برای شناسایی مولکولی استافیلوکوکوس اورئوس، به عنوان ژن تشخیص دهنده سویه‌ها، انتخاب شد [13-16]. پرایمرهای مربوط به ژن‌های *norB* با استفاده از نرم‌افزار oligo7 طراحی شد. همه پرایمرها

توسط شرکت پیشگام سنتز شدند. توالی های استفاده شده در جدول ۱ و غلظت ها و مقادیر ترکیبات فرآیند PCR در جدول ۲ اشاره شده است. واکنش ها به صورت واسرشتگی اولیه در دمای ۹۵ °C به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ دور شامل واسرشتگی (۹۵ °C به مدت ۳۰ ثانیه)، اتصال (۵۴ °C به مدت ۳۰ ثانیه) و گسترش (۷۲ °C به مدت ۳۰ ثانیه) و گسترش نهایی در دمای ۷۲ °C به مدت ۷ دقیقه انجام شد.

جدول ۱- توالی پرایمر ژن های *femA*، *norB* و *rpoD*.

Table 1- The sequence of primers for *femA*, *norB*, and *rpoD* genes.

Gene	Primers (5'-3')	Product Size (bp)	Reference
<i>femA</i>	F-CGATCCATATTTACCATATCA	450	[16]
	R-ATCAGCTCTTCGTTAGTT		
<i>norB</i>	F-ATGATTTCGTGTWGGTGAAAA	258	This study
	R-CATTTTATAGATACCTGMAGC		
<i>RpoD</i>	F- CACGAGTGATTGCTTGTC	129	[17]
	R- GATACGTAGGTCGTGGTATG		

جدول ۲- غلظت ها و مقادیر اجزاء پروسه PCR برای ژن های *femA*، *norB* و *rpoD*.

Table 2- Concentrations and volume of PCR process components for *femA*, *norB*, and *rpoD* genes.

Content	Volume (μl)	Concentration
Primers (F, R) <i>femA</i>	1	20 pmol
Primers (F, R) <i>norB</i>	1	20 pmol
Primers (F, R) <i>rpoD</i>	1	20 pmol
Master Mix PCR	12.5	2x
DNA (Templet)	1	50 ng
DW	up to 25μl	

۳-۲- تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی

برای تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله ها از دیسک های آنتی بیوتیکی پلی میکسین ب، سیپروفلوکساسین، افلوکساسین، نورفلوکساسین و لووفلوکساسین استفاده شد. از کشت ۱۸ ساعته تا ۲۴ ساعته باکتری های رشد یافته در محیط بلاداگار سوسپانسیونی با کدورتی معادل غلظت ۰/۵ مک فارلند تهیه شد. سپس از این سوسپانسیون با سواب استریل روی محیط مولر هینتون آگار در سه جهت مختلف تلقیح کرده و پس از چند دقیقه دیسک های آنتی بیوتیک با فاصله ۲۲ میلی متر از یکدیگر و ۱۶ میلی متر از جداره پلیت روی محیط قرار داده شدند. پس از آن در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد گرماگذاری شده و سپس قطر هاله عدم رشد برای کلیه آنتی بیوتیک ها پس از ۱۶ ساعت تا ۲۰ ساعت با خط کش اندازه گیری شد. از سویه استاندارد *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 جهت کنترل آزمایشات تعیین حساسیت نسبت به آنتی بیوتیک ها استفاده شد.

۴-۲- تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC)

آزمایش تعیین MIC با استفاده از محیط کشت مولر هینتون براث، محلول آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین در DMSO (۴۰۹۶ میکروگرم پودر آنتی بیوتیک در یک میلی لیتر حلال) و سوسپانسیونی باکتریایی در سرم فیزیولوژیک با کدورتی معادل غلظت ۰/۵ مک فارلند و در میکروپلیت ۹۶ خانه ای بر طبق استانداردهای CLSI انجام شد. مولر هینتون براث به تنهایی به عنوان کنترل منفی و سوسپانسیون باکتری نیز به تنهایی به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. میکروپلیت ها به مدت ۱۸ ساعت تا ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه تا ۳۷ درجه سانتی گراد گرماگذاری شدند. سپس کدورت هر خانه بررسی شده و اولین خانه از هر ستون که باکتری در آن رشد نکرده باشد، به عنوان غلظت MIC در نظر گرفته شد [18].

۵-۲- ارزیابی میزان بیان ژن *norB*

جدایه های باکتری استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم و سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس در دو محیط کشت BHI حاوی غلظت sub MIC آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین و بدون آنتی بیوتیک تا OD حدود ۰/۶ کشت داده شد. استخراج RNA توسط کیت استخراج RNX-plus (سیناژن) صورت گرفت. پس از آماده شدن RNA ساخت cDNA از آن با استفاده از کیت 2-steps RT-PCR Kit (vivantis) در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر انجام شد. واکنش Real-Time PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *rpoD* به عنوان ژن رفرنس و ژن هدف *norB* با مخلوط آماده Real-Time PCR انجام شد (جدول ۱). برای بررسی کارایی پرایمرها، واکنش real-time PCR با استفاده از غلظت های مختلف cDNA انجام شده و

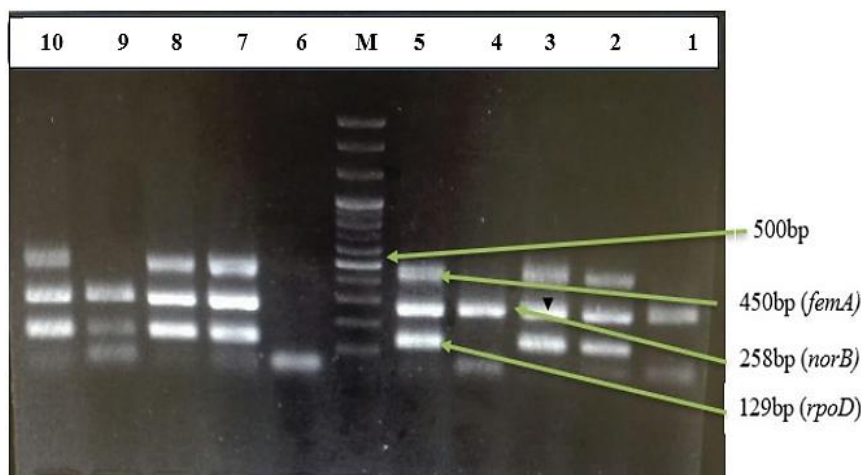
با رسم نمودار استاندارد کارایی واکنش ژن‌های *rpoD* و *norB* به ترتیب تعیین شد. واکنش در حجم ۲۰ میکرولیتر، با استفاده از ترکیب EvaGreen و مخلوط واکنش Real-Time PCR آماده (شرکت پیشگام) در دستگاه step one plus (آلمان) انجام شد. شرایط دما و زمان مورد استفاده برای Real-Time PCR در جدول ۳ بیان شده است. واکنش‌ها به صورت دو تکرار همراه با یک کنترل منفی انجام گرفت. داده‌های به دست آمده از واکنش Real-Time PCR و تغییرات بیان ژن *norB* در مقایسه با *rpoD* در حضور رقت‌های مختلف با استفاده از نرم‌افزار REST مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

جدول ۳- شرایط دمایی و زمانی Real Time PCR ژن‌های *norB* و *rpoD*.Table 3- Temperature and time conditions of Real-Time PCR of *norB* and *rpoD* genes.

Real-Time PCR Program	norB (258 bp), rpoD (115 bp)	
	Temperature	Time
40x	Denaturation	95°C 15'
	Denaturation	95°C 20"
	Annealing	54°C 20"
	Extention	72°C 30"
	Final Extension	72°C 5'

۲-۶- نتایج

از میان ۲۴۰ نمونه جمع‌آوری شده از بخش‌های بستری بیمارستان‌ها و آزمایشگاه‌های بیمارستان‌ها و درمانگاه‌های سطح شهر قم، تعداد ۸۲ جدایه با روش‌های بیوشیمیایی و کشت (گرم مثبت، کاتالاز مثبت، کواگولاز مثبت، DNase مثبت و دارای همولیز بتا) به عنوان استافیلوکوکوس اورئوس تشخیص داده شد. بررسی ژن‌های *femA*، *norB* و *rpoD* به صورت هم‌زمان و با واکنش Multiplex PCR انجام شد. از میان ۸۲ جدایه بررسی شده، ۴۰ سویه حاوی هر سه ژن *femA*، *norB* و *rpoD* تشخیص داده شدند (شکل ۱).

شکل ۱- الکتروفورز محصول Multiplex PCR ژن‌های *femA*، *norB* و *rpoD* روی ژل آگارز.Figure 1- Electrophoresis of multiplex PCR product of *femA*, *norB*, and *rpoD* genes on agarose gel.

ستون M مارکر 100 bp (شرکت سینا کلون)، ستون ۶ کنترل منفی (no DNA)، ستون ۵ کنترل مثبت (سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 25923)، ردیف‌های ۲، ۳، ۷، ۸ و ۱۰ ایزوله‌های بالینی مثبت، ردیف ۱، ۴ و ۹ ایزوله بالینی منفی می‌باشد.

نتایج ارزیابی مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها به روش دیسک دیفیوژن آگار و الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی ۴۰ جدایه مورد بررسی در جدول ۴ بیان شده است.

جدول ۴- میزان حساسیت به آنتی بیوتیک های مختلف در سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مورد بررسی.

Table 4- The sensitivity to different antibiotics in the *Staphylococcus aureus* strains.

Antibiotic (Disc)	Number of Isolates (%)		
	Sensitive	Intermediate	Resistant
Ciprofloxacin	13 (32.5)	1 (2.5)	26 (65)
Ofloxacin	12 (30)	-	28 (70)
Norfloxacin	12 (30)	1 (2.5)	27 (67.5)
Levofloxacin	11 (27.5)	-	29 (72.5)
Polymyxin B	-	-	40 (100)

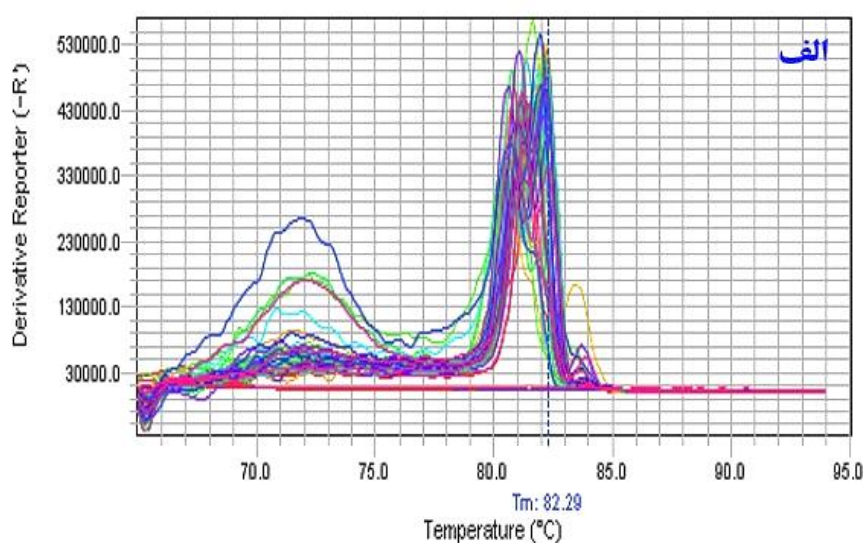
حداقل غلظت مهارکنندگی آنتی بیوتیکی ۲۶ جدایه مقاوم به دیسک آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین در جدول ۵ بیان شده است.

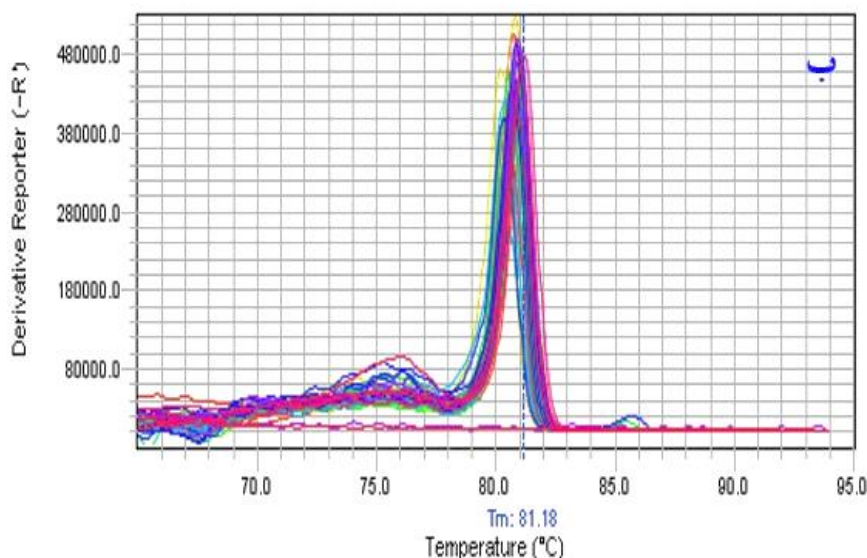
جدول ۵- حداقل غلظت مهارکنندگی آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین در سویه های استافیلوکوکوس اورئوس.

Table 5- The minimum inhibitory concentration of ciprofloxacin antibiotic in *Staphylococcus aureus* isolates.

Isolate Number	MIC (µg/ml)	Isolate Number	MIC (µg/ml)
11	32	61	128
12	16	62	256
13	32	63	168
14	16	64	256
15	128	65	64
20	128	68	128
21	64	69	64
24	128	70	256
30	16	71	256
31	128	72	128
32	32	73	64
40	256	74	32
41	128	75	16

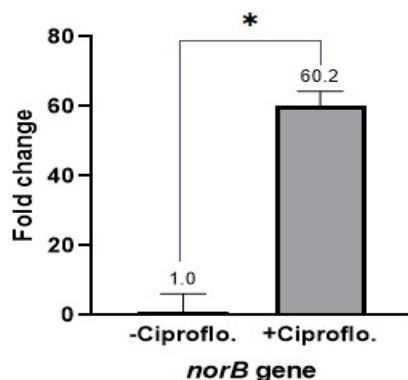
سنجش کمی بیان ژن norB در سویه های مقاوم به فلوروکینولون ها با تکنیک real-time RT-PCR انجام شد. ژن rpoD به عنوان ژن مرجع در نظر گرفته شد و میزان بیان ژن norB نسبت به ژن مرجع اندازه گیری شد. منحنی ذوب به دست آمده برای هر یک از ژن های norB و rpoD نشان دهنده اختصاصیت واکنش real-time PCR است (شکل ۲). نتایج به دست آمده نشان داد میزان بیان ژن norB در حضور آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین به طور میانگین حدود ۶۰ برابر نسبت به غیاب آنتی بیوتیک افزایش داشت (شکل ۳).





شکل ۲- منحنی‌های ذوب واکنش real-time PCR (الف) ژن *norB* و (ب) ژن *rpoD*.
Figure 2- Melting curves of real-time PCR reaction; a) *norB* gene and b) *rpoD* gene.

در این منحنی‌ها قله اضافی مشاهده نشد که نشان‌دهنده اختصاصیت واکنش است.



شکل ۳- تغییرات بیان ژن *norB* در ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به سیپروفلوکساسین در غیاب سیپروفلوکساسین و در حضور سیپروفلوکساسین.

Figure 2- Changes in *norB* gene expression in *Staphylococcus aureus* isolates resistant to ciprofloxacin in the absence of ciprofloxacin and the presence of ciprofloxacin.

نماد * نشان‌دهنده معنی‌دار بودن اختلاف بین دو گروه ($P=0.000001$) است.

۳- نتیجه‌گیری

باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در شرایط مساعد می‌تواند در تمام نقاط بدن انسان عفونت‌های شدید و خطرناک ایجاد نماید. استافیلوکوکوس اورئوس عوامل حدت‌زایی را ترشح می‌کند که در استقرار و بیماری‌زایی این باکتری در میزبان‌ها نقش دارند [19]. از آنجایی‌که این باکتری دارای ژنومی انعطاف‌پذیر است، سویه‌های بیماری‌زا و مقاوم به داروی آن گسترش یافته است [20]. یکی از مشکلات عمده در درمان و پیشگیری از عفونت‌های ایجادشده توسط استافیلوکوکوس اورئوس، مقاومت این باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف از قبیل بتالاکتام‌ها، آمینوگلیکوزیدها، ماکرولیدها و فلوروکینولون‌ها است که این مساله موجب گسترش عفونت‌های ناشی از این باکتری و همچنین بروز مشکلاتی از قبیل افزایش مرگ‌ومیر، افزایش جراحات وارده به بیماران بستری‌شده، افزایش هزینه‌های درمان به دلیل نیاز به آنتی‌بیوتیک‌های گران‌قیمت، افزایش مدت‌زمان بستری بیماران در بیمارستان‌ها و افزایش هزینه‌های بیمه‌های درمانی شده است. این مساله پزشکان را جهت درمان عفونت‌های ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس با محدودیت‌های بسیاری مواجه کرده است [1]. از همین رو در این مطالعه میزان مقاومت سویه‌های استافیلوکوک اورئوس

جدا شده از بیماران را نسبت به آنتی بیوتیک‌های فلوروکینولونی بررسی شده و نقش ژن norB را به عنوان یکی از ژن‌های دخیل در مقاومت ارزیابی شد. در مطالعه حاضر در مجموع از میان ۲۴۰ سویه مشکوک جمع‌آوری شده با استفاده از آزمون‌های رایج بیوشیمیایی و روش‌های مولکولی بررسی شدند. بر اساس نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی و کشت شامل کاتالاز، کوآگولاز، کشت در محیط مانیتول‌سالت‌آگار، بررسی همولیز در محیط بلاد آگار و بررسی خاصیت DNase، از ۲۴۰ سویه مشکوک تعداد ۸۲ جدایه به عنوان استافیلوکوکوس اورئوس شناسایی شدند. از آنجایی که این سویه‌های مشکوک توسط آزمایشگاه‌های تشخیص طبی و بیمارستانی، به عنوان استافیلوکوک گزارش شده بودند، نتیجه به دست آمده نشان داد که اغلب آزمایشگاه‌ها این نمونه‌ها را تنها تا سطح گونه شناسایی کرده و به عنوان جنس استافیلوکوکوس اورئوس گزارش می‌کنند. در نتیجه به نظر می‌رسد برای انتخاب روش درمانی موثرتر نیاز است که آزمایشگاه‌ها، تست‌های بیوشیمیایی تشخیصی استافیلوکوکوس اورئوس را تا سطح سویه ادامه دهند. هم‌چنین علاوه بر روش‌های متداول آزمایشگاهی باید از تکنیک‌های دقیق‌تری مانند روش‌های مولکولی جهت تشخیص و یا تایید سویه‌های مشکوک استفاده شود. تشخیص سریع استافیلوکوکوس اورئوس در روند بهبود بیماری و کاهش هزینه‌ها تاثیر قابل توجهی دارد [21]. استافیلوکوکوس اورئوس مجموعه‌ای از ژن‌های بسیار حفاظت‌شده‌ای را حمل می‌کند که می‌توان از این ژن‌ها برای تشخیص سریع این پاتوژن استفاده کرد. در تعداد زیادی از مطالعات مولکولی ژن محافظت شده femA به عنوان ژن شناسایی استافیلوکوکوس اورئوس بکار گرفته شده است [22]، [23]. پروتئین حاصل از این ژن جزء پروتئین‌های سیتوپلاسمی ضروری در بیوسنتز دیواره سلولی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس به خصوص در سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین است [24]. تمامی ۸۲ جدایه تایید شده توسط تست‌های بیوشیمیایی، با استفاده از روش Multiplex PCR بررسی شدند. از این میان تعداد ۴۰ جدایه (۴۸/۷۸٪) حاوی هر سه ژن femA، norB و rpoD تشخیص داده شدند. با این که ژن femA در تحقیقات متعدد به عنوان یک ژن حفاظت شده در شناسایی استافیلوکوکوس اورئوس مورد استفاده قرار می‌گیرد؛ اما نتایج برخی تحقیقات نشان می‌دهد که ژن femA قادر به شناسایی درصد بالایی از استافیلوکوکوس اورئوس‌ها نیست. چیکالا و همکاران [14] شناسایی ژن‌های مربوط به تشخیص استافیلوکوکوس اورئوس (femA، mecA، femA، nuc، 16srRNA و fem-A1) را بررسی کرده و پس از مقایسه این ژن‌ها بیان داشتند که به علت ناهمگنی ژن femA، مفید بودن این ژن به عنوان یک نشانگر اختصاصی برای گونه استافیلوکوکوس اورئوس دارای محدودیت‌هایی است. الگوی درمانی عفونت استافیلوکوکوس اورئوس ممکن است از یک منطقه به منطقه دیگر متفاوت باشد و این کاملاً به الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی آن ناحیه، فعالیت‌های مربوط به کنترل عفونت وابسته است؛ لذا جهت درمان مناسب و کنترل عفونت ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس شناخت الگوی مقاومتی آن الزامی است [25]، [26]. هم‌چنین نتایج تحقیقات متعدد نشان می‌دهد مقاومت به آنتی بیوتیک‌های فلوروکینولونی در حال افزایش است و یکی از سیستم‌های مقاومت به این نوع آنتی بیوتیک‌ها، مکانیسم پمپ افلاکس است [27]. به همین علت الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به ۴ نوع آنتی بیوتیک خانواده فلوروکینولونی بررسی شد. یافته‌های به دست آمده در الگوی آنتی بیوگرام نشان داد که تمامی ایزوله‌های به دست آمده در این تحقیق نسبت به پلی میکسین B مقاوم هستند (۱۰۰٪) که بیشترین درصد مقاومت را در بین آنتی بیوتیک‌های بررسی شده به خود اختصاص داد. هم‌چنین کمترین میزان مقاومت با ۲۶ نمونه (۶۵٪) مربوط به آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین تعیین شد. در مطالعه نیتا و همکاران که در سال ۲۰۱۳ در هند انجام شد نیز بیشترین مقاومت‌ها نسبت به پنی‌سیلین (۸۹/۲٪) و کمترین آن ونکومايسين و لینزولید (۰٪) بود و در میان فلوروکینون‌ها نیز بیشترین مقاومت نسبت به سیپروفلوکساسین (۵۷/۶٪)، اوفلوکساسین (۵۱/۲٪) و لووفلوکساسین (۳۰/۴٪) گزارش شد که مشابه نتایج این تحقیق است [28]. باین حال میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین تعیین شده در این تحقیق کمتر از میزان مقاومت گزارش شده توسط رضازاده و همکاران [29] (۸۵/۷٪) و رحیمی و همکاران [27] (۹۵٪) است. مقاومت به سیپروفلوکساسین در این تحقیق نسبت به مطالعه علی قلی و همکاران [30] (۳۸٪)، شیتو و همکاران [31] (۲۹٪)، سلطان دلال و همکاران [32] (۳٪) و پیرمردیان و همکاران [33] (۴/۷۶٪) افزایش نشان می‌دهد. تحقیقات نشان داده‌اند که افزایش استفاده از آنتی بیوتیک‌ها در توسعه انواع مقاوم به چند دارو و گردش مقاومت بین گونه‌های باکتریایی نقش داشته است [26]. همان‌طور که در این تحقیق و هم‌چنین سایر مطالعات دیده می‌شود، استافیلوکوکوس اورئوس توانسته است به اغلب آنتی بیوتیک‌های مورد استفاده در درمان مقاوم شود [34]–[36].

باکتری‌ها از جمله استافیلوکوکوس اورئوس از طریق مکانیسم‌های مختلف شامل تغییر در مسیرهای متابولیک، تولید آنزیم‌های غیرفعال‌کننده عوامل ضد میکروبی، تغییر محل‌های اثر آنتی بیوتیک‌ها و سیستم‌های افلاکس می‌توانند به عوامل ضد میکروبی مقاوم شوند [37]–[39].

در تحقیق حاضر پس از شناسایی سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین با استفاده از تکنیک آنتی بیوگرام، MIC این سویه‌ها برای آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین تعیین شده و sub MIC آن‌ها مشخص شد. سپس برای بررسی نقش احتمالی ژن norB و ارتباط آن با مقاومت نسبت به فلوروکینولون‌ها، میزان بیان این ژن برای سویه‌های مقاوم قبل از مواجهه با سیپروفلوکساسین و بعد از مواجهه با آن با تکنیک Real-Time PCR

ارزیابی شد. نتایج به‌دست‌آمده نشان داد میزان بیان ژن *norB* به‌طور میانگین پس از مواجهه سویه‌ها با آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین ۶۰ برابر افزایش داشته است. دینگ و همکاران [40] در تحقیقی مشابه نقش پمپ‌های افلاکس را در استافیلوکوکوس اورئوس MW2 در غیاب و در حضور آنتی‌بیوتیک با استفاده از روش Real-Time PCR بررسی کردند. نتایج این تحقیق نشان داد میزان بیان این ژن در حضور آنتی‌بیوتیک ۱۷۱ برابر افزایش داشته است. بررسی‌ها نشان می‌دهد مقاومت نسبت به کینولون‌ها بر اثر موتاسیون‌های کروموزومی ایجاد می‌شود که ممکن است موجب بیان بیش‌ازحد پمپ‌های افلاکس *norA*، *norB* و *norC*، *tet38* شود. سیستم‌های افلاکس به‌ویژه پمپ افلاکس *norA*، *norB* و *norC* سبب دفع آنتی‌بیوتیک و کاهش غلظت درون‌سلولی می‌شود که نتیجه آن، کاهش نفوذپذیری غشا نسبت به ترکیبات دارویی است. این پمپ‌ها نقش بسزایی در مقاومت استافیلوکوکوس اورئوس به سیپروفلوکساسین ایفا می‌کنند [6]، [9]، [10]. *NorB* مقاومت را به برخی از سوبستراهای *NorA* مانند فلوروکینولون‌های هیدروفلیک (نورفلوکساسین و سیپروفلوکساسین)، بایوسیدها و زیست‌کش‌ها (تترافیل فسفونیوم و ستریمید) و رنگ اتدیوم برماید القا می‌کند و هم‌چنین باعث القای مقاومت *NorA* به برخی از ترکیبات غیر سوبسترای خود مانند فلوروکینولون‌های هیدروفلوبیک و اسپارفلوکساسین و تراسایکلین می‌شود [40]، [41].

نتایج به‌دست‌آمده نشان می‌دهد میزان مقاومت استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین که از جمله آنتی‌بیوتیک‌های رایج مورد استفاده، در حال افزایش است و مهم‌ترین مکانیسم آن می‌تواند افزایش تولید پمپ افلاکس *norB* باشد.

تشکر و قدردانی

به این وسیله از همکاری و مساعدت مجموعه آزمایشگاه ژنتیک مولکولی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین-پیشوا تشکر می‌شود.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافی توسط نویسندگان اظهار نشده است.

منابع

- [1] Klevens, R. M., Morrison, M. A., Nadle, J., Petit, S., Gershman, K., Ray, S., ... & Fridkin, S. K. (2007). Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. *Journal of the american medical association*, 298(15), 1763–1771. DOI:10.1001/jama.298.15.1763
- [2] Sethi, S. (2002). Bacterial pneumonia: Managing a deadly complication of influenza in older adults with comorbid disease. *Geriatrics*, 57(3), 56–61.
- [3] Moreillon, P., Que, Y. A., & Bayer, A. S. (2002). Pathogenesis of streptococcal and staphylococcal endocarditis. *Infectious disease clinics of north america*, 16(2), 297–318. DOI:10.1016/S0891-5520(01)00009-5
- [4] Normanno, G., La Salandra, G., Dambrosio, A., Quaglia, N. C., Corrente, M., Parisi, A., ... & Celano, G. V. (2007). Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. *International journal of food microbiology*, 115(3), 290–296. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.049
- [5] Witte, W., Strommenger, B., Cuny, C., Heuck, D., & Nuebel, U. (2007). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the Panton-Valentine leucocidin gene in Germany in 2005 and 2006. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 60(6), 1258–1263. DOI:10.1093/jac/dkm384
- [6] Nikaido, H. (1998). Multiple antibiotic resistance and efflux. *Current opinion in microbiology*, 1(5), 516–523. DOI:10.1016/S1369-5274(98)80083-0
- [7] Acar, J. F., & Goldstein, F. W. (1997). Trends in bacterial resistance to fluoroquinolones. *Clinical infectious diseases*, 24(1), S67–S73. DOI:10.1093/clinids/24.supplement_1.s67
- [8] Marangon, F. B., Miller, D., Muallem, M. S., Romano, A. C., & Alfonso, E. C. (2004). Ciprofloxacin and levofloxacin resistance among methicillin-sensitive *staphylococcus aureus* isolates from keratitis and conjunctivitis. *American journal of ophthalmology*, 137(3), 453–458. DOI:10.1016/j.ajo.2003.10.026
- [9] Coskun-Ari, F. F., & Bosgelmez-Tinaz, G. (2008). *GrlA* and *gyrA* mutations and antimicrobial susceptibility in clinical isolates of ciprofloxacin-methicillin-resistant *staphylococcus aureus*. *European journal of medical research*, 13(8), 366–370.
- [10] Ito, H., Yoshida, H., Bogaki-Shonai, M., Niga, T., Hattori, H., & Nakamura, S. (1994). Quinolone resistance mutations in the DNA gyrase *gyrA* and *gyrB* genes of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 38(9), 2014–2023. DOI:10.1128/AAC.38.9.2014
- [11] Ouellette, M., Légaré, D., & Papadopolou, B. (1994). Microbial multidrug-resistance ABC transporters. *Trends in microbiology*, 2(10), 407–411.

- [12] Del Giudice, P., Bes, M., Hubiche, T., Roudière, L., Blanc, V., Lina, G., ... & Etienne, J. (2011). Clinical manifestations and outcome of skin infections caused by the community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone ST80-IV. *Journal of the european academy of dermatology and venereology*, 25(2), 164–169. DOI:10.1111/j.1468-3083.2010.03731.x
- [13] Davoodi, N. R., Siadat, S. D., Vaziri, F., Yousefi, J. V., Harzandi, N., Rafi, A., ... & Bahrmand, A. R. (2015). Identification of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* (CoNs) as well as detection of methicillin resistance and Pantone-Valentine Leucocidin by multiplex PCR. *Journal of pure and applied microbiology*, 9(1), 467–471.
- [14] Chikkala, R., George, N. O., Ratnakar, K. S., Iyer, R. N., & Sritharan, V. (2012). Heterogeneity in *femA* in the Indian isolates of *Staphylococcus aureus* limits its usefulness as a species specific marker. *Advances in infectious diseases*, 2(03), 82–88.
- [15] Al-Talib, H., Yean, C. Y., Al-Khateeb, A., Hasan, H., & Ravichandran, M. (2014). Rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by a newly developed dry reagent-based polymerase chain reaction assay. *Journal of microbiology, immunology and infection*, 47(6), 484–490. DOI:10.1016/j.jmii.2013.06.004
- [16] Al-Talib, H., Yean, C. Y., Al-Khateeb, A., Hassan, H., Singh, K. K. B., Al-Jashamy, K., & Ravichandran, M. (2009). A pentaplex PCR assay for the rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and panton-valentine leucocidin. *BMC microbiology*, 9, 1–8. DOI:10.1186/1471-2180-9-113
- [17] Theis, T., Skurray, R. A., & Brown, M. H. (2007). Identification of suitable internal controls to study expression of a *Staphylococcus aureus* multidrug resistance system by quantitative real-time PCR. *Journal of microbiological methods*, 70(2), 355–362. DOI:10.1016/j.mimet.2007.05.011
- [18] Bremser, W. G., & Barsky, N. P. (2004). Utilizing the balanced scorecard for R&D performance measurement. *R and d management*, 34(3), 229–238. DOI:10.1111/j.1467-9310.2004.00335.x
- [19] Dinges, M. M., Orwin, P. M., & Schlievert, P. M. (2000). Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical microbiology reviews*, 13(1), 16–34. DOI:10.1128/CMR.13.1.16-34.2000
- [20] Holden, M. T. G., Feil, E. J., Lindsay, J. A., Peacock, S. J., Day, N. P. J., Enright, M. C., ... & Parkhill, J. (2004). Complete genomes of two clinical *Staphylococcus aureus* strains: Evidence for the evolution of virulence and drug resistance. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 101(26), 9786–9791. DOI:10.1073/pnas.0402521101
- [21] Vannuffel, P., Laterre, P. F., Bouyer, M., Gigi, J., Vandercam, B., Reynaert, M., & Gala, J. L. (1998). Rapid and specific molecular identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in endotracheal aspirates from mechanically ventilated patients. *Journal of clinical microbiology*, 36(8), 2366–2368. DOI:10.1128/jcm.36.8.2366-2368.1998
- [22] Mehrotra, M., Wang, G., & Johnson, W. M. (2000). Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. *Journal of clinical microbiology*, 38(3), 1032–1035. DOI:10.1128/jcm.38.3.1032-1035.2000
- [23] Abimanyu, N., Krishnan, A., Murugesan, S., Gurumurthy, S., Krishnan, P., & others. (2013). Use of triplex PCR for rapid detection of PVL and differentiation of MRSA from methicillin resistant coagulase negative staphylococci. *Journal of clinical and diagnostic research (JCDR)*, 7(2), 215. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3592277/>
- [24] Johnson, S., Krüger, D., & Labischinski, H. (1995). *femA* of *Staphylococcus aureus*: Isolation and immunodetection. *FEMS microbiology letters*, 132(3), 221–228. DOI:10.1016/0378-1097(95)00314-U
- [25] Espinal, M. A., Laszlo, A., Simonsen, L., Boulahbal, F., Kim, S. J., Reniero, A., ... & Raviglione, M. C. (2001). Global trends in resistance to antituberculosis drugs. *New england journal of medicine*, 344(17), 1294–1303. DOI:10.1056/nejm200104263441706
- [26] Ferber, D. (2002). Antibiotic resistance: Livestock feed ban preserves drugs' power. *Science*, 295(5552), 27–28. DOI:10.1126/science.295.5552.27a
- [27] Rahimi, F., Bouzari, M., Katouli, M., & Pourshafie, M. R. (2013). Antibiotic resistance pattern of methicillin resistant and methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* isolates in Tehran, Iran. *Jundishapur journal of microbiology*, 6(2), 144–149. DOI:10.5812/jjm.4896
- [28] Gade, N. D., & Qazi, M. S. (2013). Fluoroquinolone therapy in *Staphylococcus aureus* infections: where do we stand? *Journal of laboratory physicians*, 5(02), 109–112. DOI:10.4103/0974-2727.119862
- [29] Rezazadeh, M., Yousefi Mashouf, R., Sarmadyan, H., & Ghaznavi-Rad, E. (2013). Antibiotic profile of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with multiple-drug resistances isolated from nosocomial infections in Vali-Asr Hospital of Arak. *Journal of arak university of medical sciences*, 16(2), 29–37.
- [30] Aligholi, M., Emameini, M., Hashemi, F. B., Shasavan, S., Jebelameli, F., & Kazemi, B. (2006). Determination of antimicrobial resistance pattern of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical specimens. *Tehran university medical journal*, 64(9), 26–32. (In Persian). <http://diglib.tums.ac.ir/pub/index.asp>
- [31] Shittu, A. O., Okon, K., Adesida, S., Oyedara, O., Witte, W., Strommenger, B., ... Nübel, U. (2011). Antibiotic resistance and molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* in Nigeria. *BMC microbiology*, 11, 1–8. DOI:10.1186/1471-2180-11-92
- [32] Soltan Dallal, M. M., Agha Amiri, S., Eshraghian, M., Sabour Yaraghi, A. A., Faramarzi, T., Mahdavi, V., Saberpour, F., Fazeli Fard, P., & Peymane Abedi, T. (2008). Prevalence and antibiotic resistance pattern of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food stuff. *Journal of advances in medical and biomedical research*, 16(4), 63. (In Persian). <https://www.magiran.com/paper/590777/>
- [33] Pirmoradian, M., Pourbabaie, A., Sangi, M. G., & Kalhor, N. (2013). A clinical trial of contamination of surgical instruments with *Staphylococcus aureus* during long time orthopedic surgeries. *Qom university of medical sciences journal*, 7(3), Pe62–Pe70. (In Persian). <http://journal.muq.ac.ir>

- [34] Nimmo, G. R., Bell, J. M., Mitchell, D., Gosbell, I. B., Pearman, J. W., & Turnidge, J. D. (2003). Antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* in Australian teaching hospitals, 1989-1999. *Microbial drug resistance*, 9(2), 155–160.
- [35] Picot, S., Rakotomalala, R. S., Farny, K., Simac, C., & Michault, A. (2010). Evolution de la résistance aux antibiotiques de 1997 à 2005 à la Réunion. *Medecine et maladies infectieuses*, 40(11), 617–624. DOI:10.1016/j.medmal.2010.04.001
- [36] Poole, K. (2000). Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in gram-negative bacteria. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 44(9), 2233–2241. DOI:10.1128/AAC.44.9.2233-2241.2000
- [37] Hancock, R. E. W. (1997). The bacterial outer membrane as a drug barrier. *Trends in microbiology*, 5(1), 37–42. DOI:10.1016/S0966-842X(97)81773-8
- [38] Hooper, D. C. (2000). Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones. *Clinical infectious diseases*, 31(SUPPL. 2), S24–S28. DOI:10.1086/314056
- [39] Thomson, K. S., & Smith Moland, E. (2000). Version 2000: The new β -lactamases of Gram-negative bacteria at the dawn of the new millennium. *Microbes and infection*, 2(10), 1225–1235. DOI:10.1016/S1286-4579(00)01276-4
- [40] Ding, Y., Onodera, Y., Lee, J. C., & Hooper, D. C. (2008). NorB, an efflux pump in *Staphylococcus aureus* strain MW2, contributes to bacterial fitness in abscesses. *Journal of bacteriology*, 190(21), 7123–7129. DOI:10.1128/JB.00655-08
- [41] Truong-Bolduc, Q. C., Dunman, P. M., Strahilevitz, J., Projan, S. J., & Hooper, D. C. (2005). MgrA is a multiple regulator of two new efflux pumps in *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology*, 187(7), 2395–2405. DOI:10.1128/JB.187.7.2395-2405.2005



Paper Type: Original Article



The Response of *Polianthes tuberosa* L. to the Use of Some Vitamins During Growth and Development

Mehrdad Bababrabie¹, Hossein Zarei^{2,*}

¹ Assistant Porfessor, Department Green Space Science and Engineering, Minab Higher Education Center, Hormozgan University, Hormozgan, Iran.

² Associate Professor, Department of Green Space Science and Engineering, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran; hoseinzare@yahoo.com.

Citation:

Bababrabie, M., & Zarei, H. (2023). The response of polianthes tuberosa l. to the use of some vitamins during growth and development. *The quarterly scientific journal of applied biology*, 36(3), 11-23.

Received: 02/01/2023

Accepted: 17/09/2023

Abstract

Introduction: Polianthes tuberosa L. is one of the most important cut flowers in tropical and subtropical regions and is also produced in Iran. Vitamins in small amounts are necessary for the normal growth and development of tissues and organs in the plant. This research aimed to investigate the effect of vitamins A, B, C, and E on morphological, physiological, and biochemical characteristics of the Polianthes tuberosa plant.

Methods: In the present study, vitamins B (thiamine), C (ascorbic acid), E (alpha-tocopherol), and A (retinol) were administered at three different levels of 50, 100 and 150 mg/L and during three stages (30, 40, and 50 days after planting) and were applied as a foliar spray on the seedlings of polianthes tuberosa. The morphological, physiological, and biochemical characteristics of plants were investigated.

Results: The results obtained from the analysis of variance of the data showed that the effect of the treatment on the stem length, the flower number, the floret diameter, the root length, the fresh weight of the shoot, leaf protein, reducing sugar, ascorbate peroxidase enzyme, peroxidase enzyme, catalase, the amount of essential oil, chlorophyll a, b chlorophyll and total chlorophyll and vase life at 1% level, inflorescence length and flower appearance at 5% level was significant, but there was no significant effect on stem diameter, number of leaves, leaf area, number of daughter bulbus. The results of the mean comparison data showed that the maximum inflorescence length (41.16 cm), flower diameter (79.05 mm), fresh weight of shoot (188.33 g), and vase life (10.333 days) were related to the treatment of ascorbic acid (100 mg/L) and the highest amount of bulb root length (28.80 cm) and essential oil (7.40 percent) at the concentration of 50 mg/L of ascorbic acid and the highest amount of leaf protein (0.49 mg/g of fresh weight of flower) was obtained at a concentration of 150 mg/L of ascorbic acid. Also, the highest number of florets (43.67) and reducing sugar (0.16 mg/g fresh weight of flower) was related to the concentration of 100 mg/L thiamine, and the highest activity of ascorbate peroxidase enzyme (4.76 units/mg protein) was related to the concentration of 150 mg/L of thiamine. The highest activity of peroxidase enzyme (1.63 units/mg protein) and chlorophyll a (0.518 mg/g fresh weight of flower) was related to the concentrations of 100 and 50 mg/L of alpha-tocopherol, respectively

Conclusion: In general, the results showed that vitamins, especially ascorbic acid (vitamin C), play an important role in improving the quantitative and qualitative traits of Polianthes tuberosa.

Keywords: Ascorbic acid, Growth, Polianthes tuberosa L., Stem length, Vitamins.



Corresponding Author: hoseinzare@yahoo.com



<https://doi.org/10.22051/jab.2023.42473.1536>

واکنش گل مریم (*Polianthes tuberosa* L.) به کاربرد برخی از ویتامین‌ها در زمان رشد و نمومهرداد باباریع^۱، حسین زارعی^۲^۱ استادیار، گروه علوم باغبانی و فضای سبز، مجتمع آموزش عالی میناب، دانشگاه هرمزگان، هرمزگان، ایران.^۲ دانشیار، گروه علوم باغبانی و فضای سبز، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

چکیده

مقدمه: گل مریم (*Polianthes tuberosa* L.) یکی از مهم‌ترین گل‌های بریده در مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری است که در کشور ایران نیز تولید می‌شود. ویتامین‌ها در مقادیر کم نیز برای رشد و نمو عادی بافت‌ها در گیاه ضرورت دارند. هدف از پژوهش حاضر، بررسی تاثیر ویتامین‌های A، B، C و E بر صفات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه مریم بود.

روش‌ها: در پژوهش حاضر، ویتامین‌های B (تیامین)، C (اسید اسکوربیک)، E (آلفا توکوفرول) و A (رتینول)، در سه سطح ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر و طی سه مرحله (۳۰، ۴۰ و ۵۰ روز پس از کاشت) و به صورت محلول‌پاشی روی گیاه گل مریم اعمال شدند و صفات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاهان تیمار شده نسبت به گیاهان شاهد محلول‌پاشی شده با آب مقطر مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر تیمار بر طول ساقه، تعداد گلچه، قطر گلچه، طول ریشه، وزن تر اندام هوایی، پروتئین برگ، قند احیا، آنزیم آسکوربات پراکسیداز، آنزیم پراکسیداز، کاتالاز، میزان اسانس، کلروفیل a، b و کل و عمر گلجایی در سطح ۱٪، طول گل آذین و ظهور گل در سطح ۵٪، معنی‌دار بود ولی بر قطر ساقه، تعداد برگ، سطح برگ، تعداد سوخک تاثیر معنی‌داری نداشت. مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیش‌ترین طول گل آذین (۴۱/۱۶ سانتی‌متر)، قطر گلچه (۷۹/۰۵ میلی‌متر)، وزن تر اندام هوایی (۱۸۸/۳۳ گرم) و عمر گلجایی (۱۰/۳۳۳ روز) مربوط به تیمار اسید اسکوربیک (۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) بود و بیش‌ترین میزان طول ریشه سوخ (۲۸/۸۰ سانتی‌متر) و اسانس (۷/۴۰٪) در غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر اسید اسکوربیک و بیش‌ترین میزان پروتئین برگ (۰/۴۹ میلی‌گرم بر گرم وزن تر گل) در غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر اسید اسکوربیک حاصل شد. همچنین بیش‌ترین تعداد گلچه (۴۳/۶۷) و قند احیا (۰/۱۶ میلی‌گرم بر گرم وزن تر گل) مربوط به غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر تیامین و بیش‌ترین میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (۴/۷۶ واحد بر میلی‌گرم پروتئین) مربوط به غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر تیامین بود. بیش‌ترین میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز (۱/۶۳ واحد بر میلی‌گرم پروتئین) و کلروفیل a (۰/۵۱۸ میلی‌گرم بر گرم وزن تر گل) به ترتیب مربوط به غلظت‌های ۱۰۰ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر آلفا توکوفرول بود.

نتیجه‌گیری: به طور کلی نتایج نشان داد که ویتامین‌ها به ویژه اسید اسکوربیک (ویتامین ث) نقش به‌سزایی در بهبود صفات کمی و کیفی گل مریم دارند.

کلیدواژه‌ها: اسید اسکوربیک، رشد، طول ساقه، گل مریم، ویتامین.

۱- مقدمه

گل مریم (*Polianthes tuberosa* L.) یکی از گیاهان سوخوار زینتی (Ornamental bulbous plants) است و از گل‌های بریده مهم است [44]. جنس *Polianthes* متعلق به تیره Agavaceae، بومی مکزیک و دارای ۱۲ گونه می‌باشد [1]. گل مریم از مهم‌ترین گل‌های شاخه بریدنی در ایران و جهان به شمار می‌رود و یکی از ژنوفیت‌های زینتی است که به‌صورت گسترده‌ای در نواحی ایران (استان‌های خوزستان، هرمزگان، تهران، مرکزی)

کشت می‌شود [2]. اگرچه در هر منطقه با توجه به نوع آب‌وهوای موردنیاز این گیاه در زمان‌های مختلفی کشت می‌شوند. به‌طورکلی رایج‌ترین رقم گیاه مریم که به‌صورت تجاری کشت می‌گردد، Pearl می‌باشد.

ویتامین‌ها در مقادیر کم نیز برای رشد و نمو عادی بافت‌ها در گیاه ضرورت دارند. وجود این دسته از مواد برای رشد گیاه در محیط‌های کشت بافت و برخی از آن‌ها در گیاهان گلخانه‌ای ثابت شده است و عموماً به‌عنوان کوآنزیم و یا آنزیم عمل می‌کنند [3]. افزایش رشد رویشی با کاربرد ویتامین‌ها در گوجه‌فرنگی [4]، آفتابگردان [5] و رزماری [6] گزارش شده است.

تیامین (ویتامین B) یک بخش ضروری برای بیوسنتز کوآنزیم تیامین پیروفسفات است که نقش مهمی در متابولیسم کربوهیدرات دارد. تیامین در برگ گیاهان ساخته و به ریشه منتقل می‌شود [7] و در خصوصیات فیزیولوژیکی و کنترل رشد گیاهان نقش دارد [8]. وجود تیامین برای رشد ضروریست و نقش مستقیم و غیرمستقیمی در ایجاد و توسعه ریشه‌های گیاهی دارد. کاربرد تیامین در گل داودی سبب افزایش تعداد گل شد [9]. اسید آسکوریک به‌صورت یک کوآنزیم برای کربوهیدرات‌ها و پروتئین‌هایی که در فرآیند فتوسنتز و تنفس شرکت دارند عمل کرده و به‌عنوان یک کوفاکتور تنظیم رشد روی بیش‌تر فرآورده‌های زیست‌شناسی تأثیرگذار است [7]. اسید آسکوریک یکی از مهم‌ترین آنتی‌اکسیدان‌های محلول در آب است که به‌عنوان یک مولکول آنتی‌اکسیدان درگیر در تنش‌های زنده و غیرزنده گیاهان شناخته شده است. این ترکیب به‌عنوان یک فاکتور تنظیم‌کننده رشد معرفی شده است که تأثیر زیادی بر فرآورده‌های بیولوژیکی گیاه دارد [10]. یافته‌ها نشان داد که کاربرد ویتامین B و تیامین در غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر تعداد برگ، سطح برگ، وزن تر و خشک و ترکیبات شیمیایی را در گیاه سینگونوم افزایش داد [8]. α -توکوفرول (ویتامین E) یک آنتی‌اکسیدان محلول در چربی است که تنها توسط موجودات فتوسنتز کننده مانند گیاهان و برخی جلبک‌ها و سیانوباکترها سنتز می‌شود. محل سنتز و قرارگیری توکوفرول‌ها در گیاهان پلاستیدها می‌باشد [11]. این ترکیب در تمامی قسمت‌های بافت گیاهی ذخیره می‌شود اما مقدار آن به‌طورکلی در بذر بیش‌تر است [12].

گیاه مریم برای گلدهی، زمان گلدهی مناسب، ارتفاع گل‌آذین و طول ساقه مناسب و بهبود عمر پس از برداشت نیاز به ترکیبات جدیدی علاوه بر کودهای شیمیایی دارد، بنابراین هدف از پژوهش حاضر، بررسی تأثیر ویتامین‌های A، B، C و E بر میزان رشد گیاه مریم مانند طول گل‌آذین و ساقه و تعداد گلچه به‌عنوان صفات مهم تجاری و همچنین مشخص شدن روند تغییرات صفاتی مانند آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و کلروفیل و غیره بود.

۲- مواد و روش‌ها

این پژوهش در قالب طرح کاملاً تصادفی در فروردین‌ماه سال ۱۳۹۸ در گلخانه دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان در شرایط دمای روز ۲۶ تا ۲۸ درجه سلسیوس و دمای شب ۱۴ تا ۱۶ درجه سلسیوس و رطوبت 70 ± 5 انجام شد. میزان نور موجود در فضای گلخانه با احتساب سایه‌دهی متوسط در گلخانه به میزان ۸۰۰۰-۴۰۰۰ لوکس بود. سوخ‌های یکسان گل مریم رقم Pearl با قطر ۲ سانتی‌متر و با وزن تقریبی ۴۵ گرم، از مرکز کشت و پرورش گل مریم در شهرستان دزفول تهیه شد. دو عدد سوخ گل مریم درون هر گلدان کاشته شد.

ویتامین‌های به‌کار گرفته‌شده در این پژوهش شامل ویتامین B (تیامین)، C (اسید اسکوریک)، E (آلفا توکوفرول) و A (رتینول) بودند که در سه سطح ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر و طی سه مرحله (۳۰، ۴۰ و ۵۰ روز پس از کاشت) و به‌صورت محلول‌پاشی هنگام صبح (به دلیل شدت نور کم‌تر) روی گیاهان اعمال شدند که در هر مرحله برای هر بوته ۱۰۰ میلی‌لیتر در لیتر استفاده شد. بر روی گیاهان شاهد نیز آب مقطر پاشیده شد [13]. نمونه‌ها جهت اندازه‌گیری صفات فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و پس از برداشت به آزمایشگاه گروه باغبانی دانشکده تولیدات گیاهی منتقل شدند.

صفات موردبررسی در این پژوهش شامل وزن تر اندام هوایی، تعداد گلچه، قطر گلچه، قطر ساقه، ارتفاع ساقه، ارتفاع گل‌آذین، تعداد برگ، زمان ظهور ساقه گل‌دهنده و گل‌آذین، کلروفیل، مواد جامد محلول، آنزیم کاتالاز، آنزیم پراکسیداز، آنزیم آسکوربات پراکسیداز، قندهای احیائی، پروتئین و میزان اسانس بودند.

وزن تر گل ها با استفاده از ترازوی دیجیتال مدل FX-300 با دقت ۰/۰۰۱ گرم اندازه گیری شد. قطر ساقه و گلچه بعد از برداشت توسط کولیس ورنیه دیجیتال اندازه گیری شد. صفت قطر گلچه بعد از مرحله جوانه قابل رویت هر ۵ روز یک بار توسط کولیس ورنیه دیجیتال اندازه گیری شد. سطح برگ ها پس از جدا کردن از بوته ها با استفاده از دستگاه سطح برگ سنج مدل DELTA T اندازه گیری شد. جهت اندازه گیری ارتفاع، میانگین طول ریشه سوخ های مادری و دختری، از خط کش دقیق استفاده شد.

اندازه گیری کلروفیل بر اساس روش برنس و همکاران [14] انجام شد. بدین منظور ۱ گرم برگ تازه از هر تکرار را به دقت توزین و بعد از خرد کردن درون لوله آزمایش ریخته و با ۱۰ میلی لیتر دی متیل سولفوکسید (DMSO) مخلوط شد. نمونه ها برای مدت ۳ ساعت در آون با دمای ۷۵ تا ۸۰ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. مقدار ۱ میلی لیتر از این محلول را به لوله جدیدی منتقل و با استفاده از دی متیل سولفوکساید به حجم ۵ میلی لیتر رسانده شد. از دی متیل سولفوکساید خالص به عنوان شاهد استفاده شد. نمونه ها به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر مدل Unic- 2800 مربوط به شرکت یونیکو آمریکا در طول موج های ۶۴۵، ۶۶۳ و ۴۸۰ نانومتر جهت اندازه گیری کلروفیل a، b، کلروفیل کل قرائت شد.

بررسی میزان فعالیت کاتالاز با بررسی اکسایش مقدار H_2O_2 در طول موج ۲۴۰ نانومتر انجام شد. مخلوط واکنش شامل فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی مولار (pH=7) و H_2O_2 ۱۵ میلی مولار و ۵۰ میکرو لیتر عصاره آنزیمی در یک حجم ۳ میلی لیتر بود. میزان فعالیت آنزیم به ازای میلی گرم پروتئین بیان شد (Aebi, 1984). سنجش فعالیت آنزیم در دمای ۴ درجه سلیسیوس بود.

برای اندازه گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز از گایاکول ۴۵ میلی مولار و آب اکسیژنه ۲۲۵ میلی مولار استفاده شد. به این منظور در دمای پایین ۴۷۵ میکرو لیتر هر یک از آن ها با ۵۰ میکرو لیتر عصاره مخلوط شد و ترکیب حاصل شده در طول موج ۴۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر PG Instrument+T80 خوانده شد [15].

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز بر اساس روش ناکانو و اسادا [16] اندازه گیری شد. در این روش مخلوط واکنش حاوی پتاسیم فسفات ۵۰ میلی مولار (pH=7)، آسکوربات ۰/۵ میلی مولار، آب اکسیژنه ۰/۱ میلی مولار و ۱۵۰ میکرو لیتر عصاره آنزیمی بود. فعالیت آسکوربات پراکسیداز بر اساس اکسیداسیون آسکوربیک اسید و کاهش در جذب، در طول موج ۲۹۰ نانومتر اندازه گیری شد. برای این کار ابتدا یک گرم نمونه گیاهی را با ازت مایع وزن کرده و همراه با ۵ میلی لیتر سدیم پتاسیم فسفات و pH برابر با ۷، درون هاون چینی سائیده شده و سپس محتویات داخل هاون به میکروتیوب منتقل شده و به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس میکروتیوب ها خارج شده و محلول های رویی برداشته شده و درون میکروتیوب های جدید منتقل شد و پس از آن در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد. سنجش فعالیت آنزیم در دمای ۴ درجه سلیسیوس بود.

برای اندازه گیری قند احیا ابتدا ۰/۰۲ گرم از گلبرگ با ۱۰ میلی لیتر در هاون چینی به همراه متانول سائیده سپس محتوای هاون به بشر کوچکی منتقل و روی اجاق برقی قرار داده شد تا حرارت ببینند. به محض این که به نقطه جوش رسید، حرارت قطع و محتوای بشر به کمک کاغذ صافی، صاف گردید و عصاره گیاهی به دست آمد. مقدار ۲ میلی متر از هر یک از عصاره های تهیه شده به لوله آزمایش منتقل و پس از افزودن ۲ میلی لیتر محلول سولفات مس به آن ها، و به مدت ۲۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. در این مرحله Cu^{2+} توسط آلدئید منوساکارید احیاء شده به Cu_2O تبدیل می شود و انتهای لوله آمایش رنگ قرمز آجری مشاهده می شود. پس از آن که لوله ها سرد شدند، ۲ میلی لیتر فسفر مولبیدیک اسید به آن ها اضافه و پس از چند لحظه رنگ آبی پدیدار گردید. لوله های آمایش به شدت تکان داده شدند تا این رنگ به طور یکنواخت درون لوله آمایش منتشر گردد. شدت جذب محلول ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین و با استفاده از منحنی استاندارد غلظت قندهای احیا کننده بر حسب میلی گرم بر گرم وزن تر محاسبه گردید [17].

برای سنجش پروتئین ابتدا محلول برادفورد تهیه شد و سپس ۲/۵ میلی لیتر از محلول برادفورد با ۵۰ میکرو لیتر عصاره مخلوط شده و به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی قرار داده شد و در نهایت در طول موج ۵۹۵ نانومتر قرائت شد [18].

اسانس گیری از گل ها با استفاده از روش استخراج با حلال هگزان انجام شد. برای این کار، ۱۰۰ گرم از گلچه های تازه باز شده گل مریم از ناحیه دمگل جدا شده و پس از توزین و جدا نمودن گلبرگ ها بلافاصله درون یک بالن یک لیتری ریخته شد و به حجم یک لیتر رسانیده شد. ابتدا ماده خام گیاهی در مجاورت حلال غیرقطبی هگزان در دمای ۴۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت روی هیتر مگنت دار قرار داده شده، پس از حل شدن

اسانس موجود در گلبرگ‌ها در حلال، عصاره حاصل به‌وسیله دستگاه تقطیر در خلا تغلیظ و هگزان از عصاره جدا شد. برای خالص‌سازی محلول به‌دست‌آمده الکل اتیلیک آمیخته و تا رسیدن به دمای ۴۷ درجه سانتیگراد حرارت داده شد تا اسانس کاملاً در الکل حل شود. سپس، محلول حاصل صاف و از موم جدا گردیده و در مرحله بعد، محلول الکلی جهت خارج نمودن حلال در خلا نسبی تقطیر و در نهایت اسانس خالص حاصل شد [19].

عمر گلجایی به روش رید و ایوانز [20] با در نظر گرفتن تغییر رنگ گل‌ها، ریش گلچه‌ها، میزان باز شدن گل‌ها و میزان لزج شدن انتهای ساقه به‌صورت ظاهری و روزانه مورد ارزیابی قرار گرفت. زمانی که رنگ ۵۰٪ گلچه‌ها به قهوه‌ای متمایل می‌شوند، پایان عمر گلجایی گل مریم می‌باشد که می‌تواند به همراه ریش گلچه نیز باشد که با بررسی ظاهر سنبله گل می‌توان به این موضوع پی برد. و به این صورت تعداد روز عمر گل پس از برداشت مشخص می‌گردد.

۳- نتایج و بحث

نتایج به‌دست‌آمده از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر تیمار بر طول ساقه، تعداد گلچه، قطر گلچه، طول ریشه، وزن تر اندام هوایی، پروتئین برگ، قند احیا، آنزیم آسکوربات پراکسیداز، آنزیم پراکسیداز، کاتالاز، میزان اسانس، کلروفیل a، b و کل و عمر گلجایی در سطح ۱٪، طول گل آذین و ظهور گل در سطح ۵٪، معنی‌دار بود ولی بر قطر ساقه، تعداد برگ، سطح برگ، تعداد سوختک تاثیر معنی‌داری نداشت (جدول ۱ تا جدول ۴).

جدول ۱- تجزیه واریانس تاثیر کاربرد ویتامین‌ها بر صفات مورفولوژیکی گل شاخه بریده مریم.

Table 1- Variance analysis of the effect of vitamins on the morphological characteristics of cut flowers of tuberose.

S.O.V	df	Inflorescence Length	Stem Length	Number of Floret	Floret Diameter	Stem Diameter	Number of Leaves
Treatment	12	53.22**	165.35**	13.74**	383.13**	2.16**	1.36**
Error	24	22.27	21.55	3.96	64.75	1.61	0.81
Cv (%)	-	13.62	6.40	5.10	16.02	14.50	17.14

**Significance at the 1% probability level, * Significance at the 5% probability level, ns of non-significance

جدول ۲- تجزیه واریانس تاثیر کاربرد ویتامین‌ها بر صفات مورفولوژیکی گل شاخه بریده مریم.

Table 2- Variance analysis of the effect of vitamins on the morphological characteristics of cut flowers of tuberose.

S.O.V	df	Leaf Area	Root Length	Fresh Weight of Shoot	Appearance of Flowers	Number of Bulbs
Treatment	12	2811.60 ^{ns}	60.30**	1294.65**	28.18*	3.72 ^{ns}
Error	24	1508.14	11.24	253.63	10.91	2.08
Cv (%)	-	23.80	15.23	11.62	3.66	23.56

**Significance at the 1% probability level, * Significance at the 5% probability level, ns of non-significance

جدول ۳- تجزیه واریانس تاثیر کاربرد ویتامین‌ها بر میزان کلروفیل و عمر گلجایی گل شاخه بریده مریم.

Table 3- Variance analysis of the effect of vitamins on the amount of chlorophyll and the flowering life of cut tuberose flowers.

S.O.V	Df	Chlorophyll a	Chlorophyll b	Total Chlorophyll	Vase Life
Treatment	12	0.008**	0.02**	0.071**	5.02**
Error	24	0.0005	0.002	0.004	0.64
Cv (%)	-	16.95	14.84	14.30	10.46

**Significance at the 1% probability level.

جدول ۴- تجزیه واریانس تاثیر کاربرد ویتامین‌ها بر صفات بیوشیمیایی گل شاخه بریده مریم.

Table 4- Variance analysis of the effect of vitamins on the biochemical traits of the cut flower of

S.O.V	df	Leaf Protein	Reducing Sugar	Ascorbate Peroxidase Activities	Peroxidase Activities	Catalase Activities	Amount of Essential Oil
Treatment	12	0.03**	0.003**	1.39**	0.37**	0.49**	3.22**
Error	24	0.009	0.0007	0.07	0.009	0.04	0.06
Cv (%)	-	23.63	26.98	8.003	12.30	17.36	4.56

**Significance at the 1% probability level.

۱-۳- طول گل آذین و طول ساقه

نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیش‌ترین طول گل آذین مربوط به تیمار اسید آسکوربیک ۱۰۰ میلی گرم در لیتر (۴۱/۱۶ سانتی متر) و کم‌ترین آن مربوط به تیمار آلفا توکوفرول ۱۵۰ میلی گرم در لیتر (۲۶/۵۰ سانتی متر) بود که نسبت به تیمار شاهد دارای اثر کاهشی بر طول گل آذین بود (جدول ۵).

نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیش‌ترین طول ساقه مربوط به تیمار آلفا توکوفرول ۵۰ میلی گرم در لیتر (۸۱/۳۳ سانتی متر) بود که با تیمارهای تیامین (۱۵۰ میلی گرم در لیتر)، اسید آسکوربیک (۵۰ میلی گرم در لیتر)، و آلفا توکوفرول (۱۰۰ میلی گرم در لیتر) تفاوت معنی‌داری نداشت. هم‌چنین کم‌ترین طول ساقه مربوط به تیمار شاهد بود (جدول ۵).

اسید آسکوربیک یک احیاکننده قوی، مولکولی کوچک و قابل حل در آب است که با اکسیده‌کننده‌ها واکنش دارد [21]. این ماده به‌عنوان سوبسترای اولیه در سم‌زدایی گونه‌های اکسیژن فعال از قبیل پراکسید هیدروژن و ... مطرح است [22]. و در بسیاری از فرایندهای سلولی مانند فتوسنتز نقش اساسی دارد و موجب حفاظت نوری و مقاومت به تنش‌های محیطی می‌گردد [23].

پژوهش‌های پیشین به تأثیرات مثبت اسید آسکوربیک و تیامین بر افزایش تعداد شاخه جانبی، وزن تر ساقه و ریشه و وزن تر کل گل شمعدانی و هم‌چنین تأثیر مثبت تیامین بر افزایش تعداد شاخه جانبی گل کوکب اشاره کرده‌اند [24]، [25]. اسید آسکوربیک با تأثیر بر غشاء پلاسمایی و پمپ‌های پروتونی موجب بزرگ شدن سلول می‌شود. از طرفی تیامین که در برگ‌ها سنتز می‌شود و به ریشه می‌رود رشد را کنترل می‌کند [7].

۲-۳- تعداد گلچه

نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیش‌ترین تعداد گلچه مربوط به تیمار تیامین ۱۰۰ میلی گرم در لیتر (۴۳/۶۷) و کم‌ترین تعداد گلچه مربوط به تیمار اسید آسکوربیک ۱۵۰ میلی گرم در لیتر (۳۵/۶۶) بود که نسبت به شاهد (۳۷/۶۶) دارای اثر کاهشی بر تعداد گلچه بود (جدول ۵).

به گزارش ال-فواخری و ال-طیب [9] استفاده از تیمار تیامین در گل داوودی سبب افزایش تعداد گل شده است که با پژوهش حاضر همخوانی دارد. تیمار ترکیبی اسید آسکوربیک و تیامین تأثیرات مثبتی بر رشد و بهبود کیفیت گل گلابول داشته است [26]. هم‌چنین محقوب و همکاران [27]، گزارش کردند که استفاده از تیمار تیامین در گل کوکب سبب افزایش وزن تر گیاه، تعداد گل و رنگیزه‌های فتوسنتزی شده است.

۳-۳- قطر گلچه

نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد بیش‌ترین قطر گلچه مربوط به تیمار اسید آسکوربیک ۱۰۰ میلی گرم در لیتر (۷۹/۰۵ میلی متر) و کم‌ترین آن مربوط به تیمار رتینول ۱۵۰ میلی گرم در لیتر (۴۱/۵۱ میلی متر) بود که با تیمارهای تیامین ۵۰ میلی گرم در لیتر (۴۲ میلی متر)، رتینول ۵۰ میلی گرم در لیتر (۴۱/۶۹ میلی متر)، رتینول ۱۰۰ میلی گرم در لیتر (۴۱/۵۹ میلی متر) و شاهد (۴۱/۶۱ میلی متر) تفاوت معنی‌داری نداشت (جدول ۵).

قطر گل نقش مهمی در بازاریابی گل‌های شاخه بریده دارد [28]. وجود کربوهیدرات برای باز شدن گل‌ها لازم است. این ماده سبب جذب بیش‌تر آب می‌شود که با جذب آب، تورژسانس سلول و شادابی گلبرگ‌ها زیاد شده و در نهایت قطر گل‌ها افزایش می‌یابد [29]. از طرفی اسید آسکوربیک به دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی با به تأخیر انداختن پیری توان هدایت آبی گل‌ها را افزایش می‌دهد و از این طریق باعث افزایش قطر گل می‌گردد [30]. یافته‌های حاصل از پژوهش‌های دیگر نشان داد که، کاربرد اسید آسکوربیک و تیامین باعث افزایش تعداد گل در ختمی چینی و داوودی نسبت به شاهد شد [9].



شکل ۱- تفاوت زمان ظهور گل در تیمار با اسید آسکوربیک نسبت به شاهد در گل مریم. سمت چپ تصویر: گیاه تیمار شده با اسید آسکوربیک. سمت راست تصویر: شاهد.

Figure 1- The difference in flower emergence time in the treatment with ascorbic acid compared to the control in tuberose. The left side of the image: plant treated with ascorbic acid. The right side of the image: control.



شکل ۲- تفاوت زمان ظهور گل در تیمار با تیامین نسبت به شاهد. سمت چپ: گیاه تیمار شده با تیامین. سمت راست: شاهد.

Figure 2- The difference in flower emergence time in the treatment with thiamine compared to the control. Left: plant treated with thiamine. Right: control.

۴-۳- طول ریشه سوخ

نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیش‌ترین طول ریشه مربوط به تیمار اسید آسکوربیک ۵۰ میلی‌گرم در لیتر (۲۸/۸۰ سانتی‌متر) و کم‌ترین آن مربوط به تیمار آلفا توکوفرول ۵۰ میلی‌گرم در لیتر (۱۳/۵۰ سانتی‌متر) بود که با تیمار آلفا توکوفرول ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر (۱۵/۳۰ سانتی‌متر) تفاوت معنی‌داری نداشت. تیمارهای فوق دارای اثر کاهشی بر طول ریشه نسبت به شاهد بودند (جدول ۵).

مشخص شده است که اسید آسکوربیک مجموعه‌ای از نقش‌ها را در رشد گیاهان مانند تقسیم و بزرگ شدن سلول، توسعه آن و دیگر فرآیندهای نموی بازی می‌کند. اسید آسکوربیک سنتز شده در بیش‌تر گیاهان، از طریق متابولیسم D-گلوکوز، روی رشد و توسعه گیاه تاثیرگذار است [31]. و به‌عنوان یک تنظیم‌کننده تقسیم سلولی و تمایزیابی مطرح شده است [32].

تیمار گیاه سرو خمره‌ای با تیمار سبب افزایش طول ریشه شد [33]. هم‌چنین گزارش شده است که کاربرد اسید آسکوربیک و تیمار باعث افزایش طول ساقه و ریشه سینگونیوم شد [8].

۵-۳- وزن تر اندام هوایی

نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیش‌ترین وزن تر اندام هوایی مربوط به تیمار اسید آسکوربیک ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر (۱۸۸/۳۳ گرم) و کم‌ترین آن مربوط به تیمار آلفا توکوفرول ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر (۱۱۰ گرم) بود که با تیمار آلفا توکوفرول ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر (۱۰۸/۳۳ گرم) تفاوت معنی‌داری نداشت، تیمارهای فوق نسبت به شاهد اثر منفی بر میزان وزن تر اندام هوایی داشت (جدول ۵).

کاهش وزن تر یکی از علائم پیری گل‌های شاخه بریده است. احتمال می‌رود که اسید آسکوربیک به دلیل نقش آنتی‌اکسیدانی خود در به تاخیر انداختن پیری باعث حفظ جذب آب و جلوگیری از کاهش وزن تر گل‌ها شد. حفظ آب گلبرگ با تیمارهای مختلف نقش مهمی در جلوگیری از پیری دارد [34]. ویتامین‌ها مانند اسید آسکوربیک و تیمار باعث افزایش وزن تر اندام‌های گیاهان می‌شوند [8] که در عمر پس از برداشت گل مریم به‌عنوان یک گل شاخه بریده بسیار مهم و حیاتی است.

یافته‌های گزارش‌شده روی شمعدانی نشان داد که اسید آسکوربیک و تیمار باعث افزایش وزن تر کل شد [24]. هم‌چنین نتایج ما همسو با نتایج سایر پژوهشگران مبنی بر افزایش وزن تر در گیاه همیشه‌بهار بود [35].

جدول ۵- مقایسه میانگین تاثیر ویتامین‌ها بر صفات مورفولوژیکی گل شاخه بریده مریم.

Table 5- Comparing the average effect of vitamins on the morphological characteristics of cut flowers of tuberose.

Treatment	Morphological Character							
Vitamin	Conc. (mg/L)	Inflorescence Length (cm)	Stem Length (cm)	Number of Floret	Floret Diameter (mm)	Root Length (cm)	Fresh Weight of Shoot (g)	Appearance of Flowers
Thiamine	50	40.16 ^{ab}	75.50 ^{ab}	41.66 ^{ab}	42 ^d	23.06 ^{bc}	131.67 ^{bc}	80.66 ^b
	100	38.16 ^{abc}	76.50 ^{ab}	43.67 ^a	60.02 ^b	23.06 ^{bc}	155 ^b	77 ^{bc}
	150	36.66 ^{abc}	78.33 ^a	40.33 ^{abc}	48.67 ^{bcd}	26.26 ^{bc}	145 ^b	78.33 ^{bc}
Ascorbic acid	50	37.83 ^{abc}	79.50 ^a	38.66 ^{bcd}	61.90 ^b	28.80 ^a	151.67 ^b	76.33 ^{bc}
	100	41.16 ^a	74.83 ^{ab}	40.66 ^{abc}	79.05 ^a	27.73 ^{ab}	188.33 ^a	73 ^c
	150	36 ^{abc}	70.16 ^{bc}	35.66 ^d	49.58 ^{bcd}	22 ^{cd}	145 ^b	76.33 ^{bc}
α-Tocopherol	50	35 ^{abc}	81.33 ^a	37.66 ^{bc}	45.31 ^{cd}	13.50 ^e	130 ^{bc}	73 ^c
	100	30.33 ^{cd}	79.16 ^a	39.66 ^{bc}	56.10 ^{bc}	17.10 ^d	110 ^c	74 ^{bc}
	150	26.50 ^d	76.50 ^{ab}	37.66 ^{cd}	43.71 ^{cd}	15.30 ^e	108.33 ^c	78 ^{bc}
Retinol	50	32.33 ^{bcd}	62.33 ^d	37.66 ^{cd}	41.69 ^d	22.40 ^{bcd}	128.33 ^{bc}	91.33 ^a
	100	32 ^{cd}	62.66 ^{cd}	38 ^{cd}	41.59 ^d	22.30 ^{bcd}	130 ^{bc}	91 ^a
	150	32 ^{cd}	63 ^{cd}	37.66 ^{cd}	41.51 ^d	22.22 ^{bcd}	130 ^{bc}	90.66 ^a
Control	-	32 ^{cd}	61.83 ^d	37.66 ^{cd}	41.61 ^d	22.40 ^{bcd}	128.33 ^{bc}	90.66 ^a

۳-۶- ظهور گل

نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیش‌ترین روز تا ظهور گل مربوط به تیمار رتینول ۵۰ میلی‌گرم در لیتر (۹۱/۳۳ روز) بود که با تیمارهای رتینول ۱۰۰ (۹۱ روز) و ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر (۹۰/۶۶ روز) و شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت. هم‌چنین کم‌ترین روز تا ظهور گل مربوط به تیمارهای ۵۰ میلی‌گرم در لیتر آلفا توکوفرول (۷۳ روز) و اسید آسکوربیک (۷۳ روز) بود، تیمارهای فوق نسبت به شاهد بر میزان ظهور گل اثر منفی داشتند (جدول ۵). اسید آسکوربیک به دلیل ضرورت وجود آن برای بیوسنتز جیبرلین، نقش مهم و درعین حال غیر مستقیم بر گلدهی دارد [36]. در پژوهش حاضر نیز این ماده منجر به تسریع گلدهی گردیده است. هم‌چنین نقش این ماده ممکن است به دلیل تاثیر آن بر اسید سالیسیلیک در مسیر گلدهی گیاه باشد [37]. به این دلیل شاید بتوان نقش این ویتامین در این خصوص را نسبت به سایر ویتامین‌های به کار رفته در پژوهش حاضر بیش‌تر و موثرتر دانست.

۳-۷- پروتئین برگ

نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیش‌ترین مقدار پروتئین برگ مربوط به تیمار اسید آسکوربیک ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر (۰/۴۹ میلی‌گرم بر گرم وزن تر گل) و کم‌ترین مقدار آن مربوط به تیمار رتینول ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر (۰/۱۷ میلی‌گرم بر گرم وزن تر گل) بود که با تیمار رتینول ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر (۰/۱۷ میلی‌گرم بر گرم وزن تر گل) تفاوت معنی‌داری نداشت. استفاده از تیمارهای فوق بر مقدار پروتئین برگ نسبت به شاهد دارای اثر کاهشی بود (جدول ۶).

تحقیقات مختلف در زمینه گل‌های شاخه بریده مشخص کرده است که میزان پروتئین در زمان پیری در گونه‌های مختلف کاهش پیدا می‌کند. افزایش میزان پپتیدازها در گلبرگ‌های زنبق [38] و ارکید [39] قبل از پیری باعث کاهش میزان پروتئین قبل از پیری شد. تجزیه پروتئین نشانه‌ای از تخریب غشاء سلولی می‌باشد. افزایش رادیکال آزاد اکسیژن در زمان پیری باعث تخریب پروتئین‌ها می‌شود. اسید آسکوربیک به عنوان یک آنتی‌اکسیدان با خنثی کردن رادیکال‌ها، می‌تواند تجزیه پروتئین را به تاخیر اندازد [40].

۳-۸- قند احیا

نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیش‌ترین مقدار قند احیا مربوط به تیمار تیامین ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر (۰/۱۶ میلی‌گرم بر گرم وزن تر گل) و کم‌ترین مقدار آن مربوط به تیمار رتینول ۵۰ میلی‌گرم در لیتر (۰/۰۶ میلی‌گرم بر گرم وزن تر گل) بود که با تیمارهای رتینول ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر و شاهد (۰/۰۶ میلی‌گرم بر گرم وزن تر گل) تفاوت معنی‌داری نداشت (جدول ۶).

یکی از عوامل مهم در تعیین میزان عمر گل شاخه بریده مقدار قند (میزان مواد جامد محلول) آن می‌باشد. ازاین‌رو هر چه میزان کربوهیدرات ذخیره بیش‌تر باشد طول عمر گل افزایش می‌یابد (گندابی و همکاران، ۱۳۸۷). کاربرد اسید آسکوربیک باعث افزایش قندهای محلول در گل ختمی شده است [41]. هم‌چنین نتایج پژوهش انجام‌شده روی سینگونوم نشان داد که کاربرد اسید آسکوربیک و تیامین باعث افزایش کربوهیدرات‌های گل شد [42] که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد.

جدول ۶- مقایسه میانگین تاثیر ویتامین‌ها بر صفات مورفولوژیکی گل شاخه بریده مریم.

Table 6- Average effect of vitamins on the biochemical characteristics of cut flowers of tuberose.

Treatment	Biochemical Character						
Vitamin	Conc. (mg/L)	Leaf Protein*	Reducing Sugar	Ascorbate Peroxidase Activity*	Peroxidase Activity*	Catalase Activity*	Amount of Essential Oil
Thiamine	50	0.37abc	0.09cdef	3.75cd	1.05bc	1.48bc	6.31b
	100	0.43ab	0.16a	4.04bc	0.71d	1.80ab	7.40a
	150	0.25cde	0.12abcd	4.76a	0.41e	0.86d	5.05d
Ascorbic acid	50	0.26cde	0.11bcde	3.55de	0.71d	1.05d	7.40a
	100	0.33abcd	0.13abc	4.23b	1	1.74ab	6.40b
	150	0.49a	0.09cdef	2.45h	0.29e	1.13cd	4.95d

جدول ۶- ادامه.

Tabel 6- Continued.

Treatment	Biochemical Character						
Vitamin	Conc. (mg/L)	Leaf Protein*	Reducing Sugar	Ascorbate Peroxidase Activity*	Peroxidase Activity*	Catalase Activity*	Amount of Essential Oil
α -Tocopherol	50	0.28bcde	0.09cdef	3.43def	1.17b	1.90a	5.61c
	100	0.29bcde	0.14ab	2.85gh	1.63a	1.53b	4.40e
	150	0.34abc	0.08def	2.46h	0.92c	1.04d	4.22e
Retinol	50	0.17de	0.06ef	3.13efg	0.64d	0.85d	6.26b
	100	0.17de	0.06ef	3.10fg	0.61d	0.84d	6.22b
	150	0.17de	0.05f	3.05fg	0.60d	0.84d	6.12b
Control	-	0.17de	0.06ef	3.12efg	0.62d	0.84d	5.01d

*(mg of protein); Conc.: concentration

In each column, means with the same letters are not significant using the LSD test at the 5% and 1% difference levels.

۹-۳- آنزیم های آنتی اکسیدان

نتایج مقایسه میانگین داده ها نشان داد که بیش ترین میزان آنزیم آسکوربات پراکسیداز مربوط به تیمار تیامین ۱۵۰ میلی گرم در لیتر (۴/۷۶) واحد بر میلی گرم پروتئین) و کم ترین آن مربوط به تیمار آلفا توکوفرول ۱۵۰ میلی گرم در لیتر (۲/۴۶) واحد بر میلی گرم پروتئین) بود که نسبت به ۳/۱۲ واحد بر میلی گرم پروتئین) شاهد دارای اثر کاهشی بر میزان آنزیم آسکوربات پراکسیداز بود. بیش ترین میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز مربوط به تیمار آلفا توکوفرول ۱۰۰ میلی گرم در لیتر (۱/۶۳) واحد بر میلی گرم پروتئین) بود و کم ترین میزان آن مربوط به تیمار اسید آسکوربیک ۱۵۰ میلی گرم در لیتر (۰/۲۹) واحد بر میلی گرم پروتئین) بود که با تیمار تیامین ۱۵۰ میلی گرم (۰/۴۱) واحد بر میلی گرم پروتئین) تفاوت معنی داری نداشت و نسبت به شاهد دارای اثر کاهشی بر آنزیم پراکسیداز بود. بیش ترین میزان آنزیم کاتالاز مربوط به تیمار آلفا توکوفرول ۵۰ میلی گرم در لیتر (۱/۹۰) واحد بر میلی گرم پروتئین) و کم ترین میزان آن مربوط به تیمار شاهد و رتینول ۱۵۰ میلی گرم در لیتر (۰/۸۴) واحد بر میلی گرم پروتئین) بود که با تیمارهای رتینول (۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر)، آلفا توکوفرول (۱۵۰ میلی گرم در لیتر)، تیامین (۱۵۰ میلی گرم در لیتر) و اسید آسکوربیک (۵۰ میلی گرم در لیتر) تفاوت معنی داری نداشت. (جدول ۶).

آنزیم های آنتی اکسیدانی مانند کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز، پراکسیداز، پلی فنول اکسیداز و آسکوربات پراکسیداز در پاک سازی رادیکال های آزاد اکسیژن در سلول نقش دارند [43]. مطالعات زیادی به بررسی تاثیر توکوفرول ها بر پایداری اکسیداتیو روغن ها و لیپیدها پرداخته اند [44-47]. در این پژوهش ها اثربخشی توکوفرول ها بر مهار تشکیل پراکسید مشخص شده است اما از تغییرات توکوفرول طی زمان اکسیداسیون گزارشی در دسترس نیست. دیکسیت و همکاران [48]، گزارش کردند که در گیاه نخود در حضور آسکوربات، فعالیت چرخه گلوکوتاتیون آسکوربات و در نتیجه جمع آوری کننده های H_2O_2 افزایش می یابد، و به دنبال آن گیاه با افزایش فعالیت کاتالاز با تنش اکسیداتیو ناشی از فلزات سنگین مقابله می کند. اسید آسکوربیک با نقش کوفاکتوری در فتوسنتز گیاه و در سنتز اتیلن، جیبرلین و آنتوسیانین به عنوان عاملی برای کاهش اثر منفی تنش های عناصر سنگین شناخته شده است [49]، [50].

۱۰-۳- مقدار اسانس

نتایج مقایسه میانگین داده ها نشان داد که بیش ترین مقدار اسانس مربوط به تیمار اسید آسکوربیک ۵۰ میلی گرم بر لیتر ۷/۴۰٪ بود که با تیمار تیامین (۱۰۰ میلی گرم در لیتر) تفاوت معنی داری نداشت. هم چنین کم ترین مقدار آن مربوط به تیمار آلفا توکوفرول ۱۵۰ میلی گرم در ۴/۲۲٪ بود که با تیمار آلفا توکوفرول ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر ۴/۲۲٪ تفاوت معنی داری نداشت. تیمارهای فوق نسبت به تیمار شاهد اثر کاهشی بر میزان اسانس داشتند (جدول ۶).

تیامین با کاتالیز کردن ساخت ۱-دئونوکسی-دی-زایلولوز-۵-فسفات (DOXP) به عنوان پیش ماده بیوسنتز ترپن ها در تولید اسانس گیاهان نقش دارد [51].

۱۱-۳- کلروفیل a, b و کل

مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیش‌ترین مقدار کلروفیل a مربوط به تیمار آلفا توکوفرول ۵۰ میلی‌گرم در لیتر (۰/۵۱۸ میلی‌گرم بر گرم وزن تر گل) و کم‌ترین آن مربوط به تیمار اسید آسکوربیک ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر (۰/۲۱۰ میلی‌گرم بر گرم وزن تر گل) بود که نسبت به شاهد اثر کاهشی داشت. بیش‌ترین مقدار کلروفیل b مربوط به شاهد (۰/۲۵۹ میلی‌گرم بر گرم وزن تر گل) بود که با تیمار آلفا توکوفرول ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر (۰/۲۳۰ میلی‌گرم بر گرم وزن تر گل) تفاوت معنی‌داری نداشت و کم‌ترین مقدار آن مربوط به تیمار اسید آسکوربیک ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر (۰/۰۸۶ میلی‌گرم بر گرم وزن تر گل) بود. بیش‌ترین مقدار کلروفیل کل مربوط به شاهد (۰/۶۹۲ میلی‌گرم بر گرم وزن تر گل) و کم‌ترین میزان آن مربوط به تیمار اسید آسکوربیک ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر (۰/۲۹۶ میلی‌گرم بر گرم وزن تر گل) بود (جدول ۷).

نتایج پژوهش روی گیاهان رازیانه و فیلودندرون نشان داده است که آمینواسیدها باعث افزایش مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی می‌شوند [52]، [53]. هم‌چنین گزارش شده است که اسید آسکوربیک به‌عنوان یک کوآنزیم در واکنش‌های آنزیمی عمل می‌کند و به‌واسطه ایجاد دگرگونی در کربوهیدرات‌ها، چربی‌ها و پروتئین‌ها باعث بهبود فتوسنتز و تنفس می‌شوند [28]. هم‌چنین تیمار ترکیبی اسید آسکوربیک و تیامین در گل گلابول سبب افزایش میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی شد [26]. افزایش رنگیزه‌های فتوسنتزی در گیاه کروتون با کاربرد بنزیل آدنین و اثر مثبت تیامین بر افزایش رنگیزه‌های فتوسنتزی کوکب توسط پژوهشگران گزارش شده است [8]، [27].

تیمار اسید آسکوربیک در گیاهان ریحان سبب افزایش میزان کلروفیل a و b شد. هم‌چنین افزایش اسید آسکوربیک سبب افزایش میزان کلروفیل شد. افزایش میزان کلروفیل در گیاهان مختلف در اثر استفاده از تیمار اسید آسکوربیک گزارش شده است که علت آن را به تحریک بیوسنتز کلروفیل و تاخیر در پیری برگ توسط اسید آسکوربیک نسبت داده‌اند [54-56].

نتایج پژوهش‌های فوق با نتایج این پژوهش مبنی بر کاهش میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی در اثر تیمار با اسید آسکوربیک هم‌خوانی ندارد.

جدول ۷- مقایسه میانگین تاثیر ویتامین‌ها بر صفات بیوشیمیایی گل شاخه بریده مریم.

Table 7- Average effect of vitamins on the amount of chlorophyll and the flowering life of cut flowers of tuberose.

Treatment Vitamin	Conc. (mg/L)	Physiological character			Vase Life (Day)
		Chlorophyll* a	Chlorophyll* b	Total Chlorophyll*	
Thiamine	50	0.434ab	0.127bcd	0.561c	7.333def
	100	0.312cde	0.126bcd	0.438de	8cde
	150	0.282def	0.114cde	0.395ef	9abc
Ascorbic acid	50	0.426b	0.092de	0.518cd	7def
	100	0.321cde	0.156b	0.478cde	10.333a
	150	0.210f	0.086e	0.296fg	8.333bcd
α-Tocopherol	50	0.518a	0.135bc	0.654ab	7def
	100	0.382bc	0.230a	0.612b	7def
	150	0.353bcd	0.128bcd	0.481cde	9abc
Retinol	50	0.414b	0.107cde	0.522cd	7def
	100	0.292def	0.106cde	0.399ef	6.666ef
	150	0.263ef	0.094de	0.357ef	6.666ef
Control	-	0.433ab	0.259a	0.692a	7def

* (mg/g fresh weight of flower)

In each column, means with the same letters are not significant using the LSD test at the level of 5% and 1% difference.

۱۲-۳- عمر گلجایی

نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیش‌ترین عمر گلجایی مربوط به تیمار اسید آسکوربیک ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر (۱۰/۳۳۳ روز) و کم‌ترین آن مربوط به غلظت‌های ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر رتینول (۶/۶۶۶ روز) بود که نسبت به شاهد (۷ روز) اثر معنی‌دار نداشتند (جدول ۷).

پیری در گیاهان یک فرایند اکسیداتیو و کنترل شده است و شامل تغییرات بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی، هورمونی و ساختاری است که باعث تخریب درشت مولکول‌ها مانند پروتئین، اسیدهای نوکلئیک و لیپیدها می‌شود [57]. تنش اکسیداتیو از عدم تعادل در تولید و متابولیسم گونه‌های فعال

اکسیژن ناشی می‌شود. این ترکیبات با مولکول‌های حیاتی مختلف سلولی از جمله لیپیدهای غشای سلولی واکنش پیدا کرده و باعث تخریب آن‌ها می‌شود [58].

از اسید آسکوربیک به‌عنوان محلول حفاظت‌کننده گل‌های بریده استفاده می‌شود [59]. اسید آسکوربیک نه تنها یک آنتی‌اکسیدان است بلکه به نظر می‌رسد در زمان گلدهی، توسعه پیری، مرگ برنامه‌ریزی سلولی شده و پاسخ به بیماری‌ها از طریق شبکه پیام‌رسانی پیچیده نقش دارد [37]. سوچاتا و همکاران [60] گزارش کردند که اسید آسکوربیک در گل‌های ژبراً سبب تاخیر در پیری گردید. هم‌چنین ماندگاری گل‌های زنجبیل قرمز تیمار شده با اسید آسکوربیک با کاهش تنفس و تولید اتیلن طولانی‌تر گردید [10]. گل‌های رز رقم "سامانتا" تیمار شده با اسید آسکوربیک که تحت تنش آبی قرار گرفته بودند، ماندگاری بیش‌تری نسبت به شاهد داشتند [59]. در واقع اسید آسکوربیک به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان باعث کاهش اثرات تنش آبی بعد از برداشت می‌شود.

در پژوهشی اسید آسکوربیک بر کیفیت و عمر پس از برداشت گل شاخه بریده گلابول معنی‌دار شد [61] که با پژوهش حاضر مطابقت دارد.

تشکر و قدردانی

از اعضای گروه علوم باغبانی و فضای سبز دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان تقدیر می‌گردد.

اعلام تعارض منافع

نویسنده اعلام می‌نماید در مقاله ارایه شده به طور کامل از جمله سرقت ادبی، سوء رفتار، جعل داده‌ها و یا ارسال و انتشار دوگانه پرهیز نموده است و منافع تجاری در این راستا نداشته است.

منابع

- [1] Shagufta Naz. (2012). In vitro propagation of tuberose (*Polianthes tuberosa*). *Journal of medicinal plants research*, 6(24), 4107–4112. DOI: 10.5897/jmpr12.647
- [2] Jowkar, M. M., & Salehi, H. (2006). The Effects of different preservative solutions on the Vase life of Cut tuberose (*Polianthes tuberosa* L.) cv. Goldorosht-e-Mahallat. *JWSS-isfahan university of technology*, 10(3), 299–309.
- [3] Antonopoulou, C., Dimassi, K., Therios, I., Chatzissavvidis, C., & Tsirakoglou, V. (2005). Inhibitory effects of riboflavin (Vitamin B2) on the in vitro rooting and nutrient concentration of explants of peach rootstock GF 677 (*Prunus amygdalus* $\times$ *P. persica*). *Scientia horticulturae*, 106(2), 268–272.
- [4] Abdel-Halim, S. M. (1995). Effect of some vitamins as growth regulators on growth, yield and endogenous hormones of tomato plants during winter. *Egyptian journal of applied sciences*, 10(12), 322–334. https://ejoh.journals.ekb.eg/article_1326_9ee9187d5bc143e431397588af234a4a.pdf
- [5] K.M, G. E.-D. (2005). Physiological studies on the effect of some vitamins on growth and oil content in sunflower plant. *Egyption journal of basic and applied science*, 20, 560–571.
- [6] Youssef, A. A., & Talaat, I. M. (2003). Physiological response of rosemary plants to some vitamins. *Egyptian pharmaceutical journal [national research center]*, 1(1), 81–93.
- [7] Nahed, G. A. A., Lobna, S. T., & Soad, M. M. I. (2009). Some studies on the effect of putrescine, ascorbic acid and thiamine on growth, flowering and some chemical constituents of gladiolus plants at nubaria. *Ozean journal of applied sciences*, 2(2), 169–179.
- [8] El-Aziz, N. G. A., El-Quesni, F. E. M., & Farahat, M. M. (2007). Response of vegetative growth and some chemical constituents of *Syngonium podophyllum* L. to foliar application of thiamine, ascorbic acid and kinetin at Nubaria. *World journal of agricultural sciences*, 3(3), 301–305. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/20073155892>
- [9] El-Fawakhry, F. M., & El-Tayeb, H. F. (2003). Effect of some amino acids and vitamins on chrysanthemum production. *Journal agriculture research alexandria university*, 8(4), 755–766.
- [10] Ieamtim, P., Buanong, M., & Kanlayanarat, S. (2008). Role of ascorbic acid on vase life of red ginger (*alpinia purpurata* (vieill.) k. schum) [presentation]. *Acta horticulturae* (pp. 287–290). DOI: 10.17660/actahortic.2008.804.39
- [11] Arango, Y., & Heise, K.-P. (1998). Localization of α -tocopherol synthesis in chromoplast envelope membranes of *Capsicum annuum* L. fruits. *Journal of experimental botany*, 49(324), 1259–1262.
- [12] Sheppard, A. J., Pennington, J. A. T., & Weihrauch, J. L. (1993). Analysis and distribution of vitamin E in vegetable oils and foods. In *Vitamin e in health and disease* (pp. 9–32). CRC Press.

- [13] Anwar, M., Sahito, H. A., Hassan, I., Abbasi, N. A., Ahmed, H. A., Bhatti, M. A., ... Abro, A. (2014). Effect of pre harvest treatment of salicylic on growth and vase life of tuberose with aroma environment. *Wudpecker journal of agricultural research*, 3(2), 50-57.
- [14] Barnes, J. D., Balaguer, L., Manrique, E., Elvira, S., & Davison, A. W. (1992). A reappraisal of the use of DMSO for the extraction and determination of chlorophylls a and b in lichens and higher plants. *Environmental and experimental botany*, 32(2), 85-100.
- [15] In-Byung, C., Motomura, S. K., Inamota, M. D., & Mori, G. (2007). Multivariate analysis of relation between preharvest environmental factors, postharvest morphological and physiological factors, and vase life of cut 'Asami Red' roses. *Journal of the japanese society for horticultural science*, 76, 66-72.
- [16] Nakano, Y., & Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and cell physiology*, 22(5), 867-880. DOI: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232
- [17] Somogyi, M., & others. (1952). Notes on sugar determination. *Journal of biological chemistry*, 195, 19-23.
- [18] Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- [19] Kheiry, A., Khalighi, A., Mostofi, Y., & Naderi, R. (2011). Effects of gibberellic acid (GA3) and benzyladenine on tuberose quality and quantity. *Journal of crops improvement*, 13(1), 9-20. (In Persian). https://jci.ut.ac.ir/article_23992_en.html
- [20] Evans, R. Y., & Reid, M. S. (1988). Changes in carbohydrates and osmotic potential. *Journal of the american society for horticultural science*, 113(6), 884-888. https://ucanr.edu/sites/Postharvest_Technology_Center_/files/228403.pdf
- [21] Smirnoff, N. (2005). *Antioxidants and reactive oxygen species in plants*. Wiley Online Library.
- [22] Conklin, P. L., & Barth, C. (2004). Ascorbic acid, a familiar small molecule intertwined in the response of plants to ozone, pathogens, and the onset of senescence. *Plant, cell & environment*, 27(8), 959-970.
- [23] Shigeoka, S., Ishikawa, T., Tamoi, M., Miyagawa, Y., Takeda, T., Yabuta, Y., & Yoshimura, K. (2002). Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of experimental botany*, 53(372), 1305-1319.
- [24] El-Lethy, S. R., Ayad, H. S., & Reda, F. (2011). Effect of riboflavin, ascorbic acid and dry yeast on vegetative growth, essential oil pattern and antioxidant activity of geranium (*Pelargonium graveolens* L.). *American-eurasian journal of agricultural & environmental sciences*, 10(5), 781-786.
- [25] Rosales, M. A., Ruiz, J. M., Hernández, J., Soriano, T., Castilla, N., & Romero, L. (2006). Antioxidant content and ascorbate metabolism in cherry tomato exocarp in relation to temperature and solar radiation. *Journal of the science of food and agriculture*, 86(10), 1545-1551.
- [26] Bedour, A. A. L., & Rawia, A. E. (2011). Improving gladiolus growth, flower keeping quality by using some vitamins application. *Journal of american science*, 7(3), 169-174.
- [27] Mahgoub, M. H., Abd El Azis, N., & Mazhar, A. M. A. (2011). Response of Dahlia pinnata L. plant to foliar spray with putrescine and thiamine on growth, flowering and photosynthetic pigments. *Am eurasian j agric environ sci*, 10(5), 769-775.
- [28] Hajreza, M. R., Hadavi, E., Zeynanlou, A. A., Mirzapour, M. H., & Naeini, M. R. (2013). Effect of different levels of citric acid and salicylic acid at pre-harvesting stage on vase-life of rose (*Rosa hybrida* L.) cut flower. *Journal of science and technology of greenhouse culture-isfahan university of technology*, 4(16), 99-109. (In Persian). <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/20143039077>
- [29] Ichimura, K., & Goto, R. (2002). Extension of vase life of cut Narcissus tazetta var. chinensis flowers by combined treatment with STS and gibberellin A3. *Journal of the japanese society for horticultural science*, 71(2), 226-230. DOI: 10.2503/jjshs.71.226
- [30] M.A, A., F, N., F, S., & S, and A. (2001). Effect of some chemicals on keeping quality and vase life of (*Gladiolus grandiflorus* sect. Blandus cv. Aarti) by using leaves of allelopathic plants. *African journal of biotechnology*, 9(30), 4681-4686.
- [31] El-Kobisy, O.S., K.A. Kady, R. A. M. and R. A. A. (2005). Response of pea plant (*Pisum sativum* L.) to treatment with ascorbic acid. *Egyptian journal of applied sciences, Zagazig University*, 20(6A), 36-50.
- [32] Blokhina, O., Virolainen, E., & Fagerstedt, K. V. (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of botany*, 91(2), 179-194.
- [33] Nahed, Aziz, G. A., Azza, Mazher, A. M., & Farahat, M. M. (2010). Response of vegetative growth and chemical constituents of thuja orientalis l. plant to foliar application of different amino acids at nubaria. *Journal of american science*, 6(3), 295-301.
- [34] Ezhilmathi, K., Singh, V. P., Arora, A., & Sairam, R. K. (2007). Effect of 5-sulfosalicylic acid on antioxidant activity in relation to vase life of *Gladiolus* cut flowers. *Plant growth regulation*, 51(2), 99-108. DOI: 10.1007/s10725-006-9142-2
- [35] Menesi, F. A., Nofal, E. M. S., & El-Mahrouk, E. M. (1991). Effect of some growth regulators on *Calendula officinalis* L. *Egyptian journal of applied science*, 6, 1-15.
- [36] Razem, F. A., El-Kereamy, A., Abrams, S. R., & Hill, R. D. (2006). The RNA-binding protein FCA is an abscisic acid receptor. *Nature*, 439(7074), 290-294.
- [37] Barth, C., De Tullio, M., & Conklin, P. L. (2006). The role of ascorbic acid in the control of flowering time and the onset of senescence. *Journal of experimental botany*, 57(8), 1657-1665.
- [38] Van Doorn, W. G., & D'hont, K. (1994). Interaction between the effects of bacteria and dry storage on the opening and water relations of cut rose flowers. *Journal of applied microbiology*, 77(6), 644-649.

- [39] Lerslerwong, L., Ketsa, S., & van Doorn, W. G. (2009). Protein degradation and peptidase activity during petal senescence in *Dendrobium* cv. Khao Sanan. *Postharvest biology and technology*, 52(1), 84–90.
- [40] Noctor, G., & Foyer, C. H. (1998). Ascorbate and Glutathione: Keeping Active Oxygen under Control. *Annual review of plant biology*, 49(1), 249–279. DOI: 10.1146/annurev.arplant.49.1.249
- [41] El-Quesni, F., El-Aziz, A., & Maga, M. (2009). Some studies on the effect of Ascorbic Acid and α -tocopherol on the growth and some chemical composition of *Hibiscus rosa sinensis* L. *Ozean journal*, 2(2), 159–167.
- [42] El-Aziz, N. G. A. (2007). Stimulatory effect of NPK fertilizer and benzyladenine on Aebi, H. *Methods in enzymology*, 121–126.
- [43] Agarwal, S., & Pandey, V. (2004). Antioxidant enzyme responses to NaCl stress in *Cassia angustifolia*. *Biologia plantarum*, 48(4), 555–560. DOI: 10.1023/B:BIOP.0000047152.07878.e7
- [44] Huang, C., He, W., Guo, J., Chang, X., Su, P., & Zhang, L. (2005). Increased sensitivity to salt stress in an ascorbate-deficient *Arabidopsis* mutant. *Journal of experimental botany*, 56(422), 3041–3049.
- [45] Blekas, G., Tsimidou, M., & Boskou, D. (1995). Contribution of α -tocopherol to olive oil stability. *Food chemistry*, 52(3), 289–294.
- [46] Frankel, E. N., Huang, S.-W., Kanner, J., & German, J. B. (1994). Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: bulk oils vs emulsions. *Journal of agricultural and food chemistry*, 42(5), 1054–1059.
- [47] Martínez de la Cuesta, P. J., Rus Martínez, E., & Galdeano Chaparro, M. (1995). Enranciamiento oxidativo de aceites vegetales en presencia de α -tocoferol. *Grasas y aceites*, 46(6), 349–353. DOI: 10.3989/gya.1995.v46.i6.951
- [48] Dixit, V., Pandey, V., & Shyam, R. (2001). Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad). *Journal of experimental botany*, 52(358), 1101–1109.
- [49] Smirnoff, N., & Wheeler, G. L. (2000). Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. *Critical reviews in plant sciences*, 19(4), 267–290.
- [50] Chen, Z., & Gallie, D. R. (2004). The ascorbic acid redox state controls guard cell signaling and stomatal movement. *The plant cell*, 16(5), 1143–1162.
- [51] Dubey, V. S., Bhalla, R., & Luthra, R. (2003). An overview of the non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. *Journal of biosciences*, 28, 637–646.
- [52] Hassanein, R. A. M. (2003). *Effect of some amino acids, trace elements and irradiation on fennel (foeniculum vulgare l.)* [Mster Thesis].
- [53] Abou Dahab, T. A. M., & El-Aziz, N. G. A. (2006). Physiological effect of diphenylamin and tryptophan on the growth and chemical constituents of *Philodendron erubescens* plants. *World journal of agricultural sciences*, 2(1), 75–81.
- [54] El-Wahed, M., Amin, A. A., & Rashad, E. M. (2006). Physiological effect of some bioregulators on vegetative growth, yield and chemical constituents of yellow maize plants. *World journal of agricultural sciences*, 2(2), 149–155. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/20073201725>
- [55] El-Gabas, N. M. M. (2006). Physiological studies on the effect of ascorbic acid and micronutrients on sunflower plants grown under salinity stress'. B. Sc.(Botany). *Faculty of Science, Al-Azhar University*.
- [56] Salem, H. M., Abdel-Rahman, S., & Mohamed, S. I. (2000). Response of sugar beet plants to boron and ascorbic acid under filed conditions'. *Journal faculty education, Ain Shams University*, 48, 1–20.
- [57] Buchanan-Wollaston, V. (1997). The molecular biology of leaf senescence. *Journal of experimental botany*, 48(307), 181–199. DOI: 10.1093/jxb/48.2.181
- [58] Hossain, Z., Kalam Azad Mandal, A., Kumar Datta, S., & Krishna Biswas, A. (2006). Decline in ascorbate peroxidase activity - A prerequisite factor for tepal senescence in gladiolus. *Journal of plant physiology*, 163(2), 186–194. DOI: 10.1016/j.jplph.2005.03.004
- [59] Jin, J., Shan, N., Ma, N., Bai, J., & Gao, J. (2006). Regulation of ascorbate peroxidase at the transcript level is involved in tolerance to postharvest water deficit stress in the cut rose (*Rosa hybrida* L.) cv. Samantha. *Postharvest biology and technology*, 40(3), 236–243. DOI: 10.1016/j.postharvbio.2006.01.014
- [60] Sujata, A., Vijaai Singh, N., & and Sharma, T. . (2003). Effect of chemical preservative on enhancing vase life of *Gerbera* treatment with STS and Gibberelin A3. *Journal of the japanese society for horticultural science*, 71, 216–230.
- [61] Ravanbakhsh, A., Mobasser, H. R., & Hasandokht, M. R. (2017). Effect of ascorbic acid and acetyl salicylic acid on the quality and vase life of cut flowers *Gladiolus* (*Gladiolus persicus*). *International journal of agriculture and biosciences*, 6(1), 31–33. <http://www.ijagbio.com/pdf-files/volume-6-no-1-2017/31-33.pdf>



Paper Type: Original Article



Effect of Blood of Different Vertebrates on Reproductive Parameters of *Hirudo orientalis*

Dariush Bozorgi¹, Hossein Rahmani^{1,*}, Sohrab KohestanEskandari¹, Khosrow Jani Khalili¹

¹ MSc Student, Department of Fisheries, Faculty of Animal Science and Fisheries, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Sari, Iran. MSc Student, dariushbozorgi61@gmail.com; Associate Professor, shemaya1975@yahoo.com; Instructor, s.e.kohestan@gmail.com; PhD, janikhalili1@yahoo.com.

Citation:

Bozorgi, D., Rahmani, H., KohestanEskandari, S., & Jani Khalili, Kh. (2023). Effect of blood of different vertebrates on reproductive parameters of *Hirudo orientalis*. *The quarterly scientific journal of applied biology*, 36 (3), 24-33.

Received: 15/10/2022

Accepted: 17/09/2023

Abstract

Introduction: Among freshwater invertebrates, leeches are one of the main groups of the world's most widely distributed water resource communities, found in almost all types of freshwater habitats. This study aimed to investigate the effect of different blood treatments (Horse, cow, sheep, and chicken) on the reproduction parameters of Caspian leeches, and it was done with three repetitions in 2019.

Methods: In each replication, 10 progenitors were bred over 5 months once fed with blood treatments. At the end of the period, the number of cocoons and larvae were counted, and the cocoons' length, weight and diameter characteristics were measured.

Results: The results showed that in the growth parameters, including the final weight of the generators, the percentage of body weight gain and the specific growth coefficient in chicken (3.06, 461.5, 0.086) and horse (5.22, 857.2, 0.113) treatments were the lowest and highest, respectively ($p < 0.05$). The results of the parameters of reproduction, including weight, diameter and length of cocoons in different treatments, showed that in chicken (0.205, 0.6, 0.6) and horse (0.785, 1.16, 1.5) treatments were the lowest and highest values, respectively ($p < 0.05$). The amount of protein that can be absorbed has also been shown to be almost standard in cow and horse blood.

Conclusion: Based on the results of this experiment and according to the studied parameters, horse and cow blood had the best performance and sheep and chicken treatments are not suitable for the reproduction of Caspian leeches.

Keywords: Growth, Reproduction, Cocoon opening, Blood sources.





تأثیر خون مهره‌داران مختلف روی پارامترهای تولیدمثلی زالوی شرقی *Hirudo orientalis*

داریوش بزرگی^۱، حسین رحمانی^{۱*}، کوهستان اسکندری^۱، خسرو جانی خلیلی^۱

^۱گروه شیلات، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.

چکیده

مقدمه: در بین بی‌مهرگان آب شیرین، زالوها یکی از گروه‌های اصلی موجودات زنده منابع آبی با توزیع جهانی است که تقریباً در همه نوع زیستگاه‌های آب شیرین یافت می‌شوند. تحقیق حاضر با هدف بررسی اثر گروه‌های آزمایشی خونی شامل اسب، گاو، گوسفند و مرغ روی پارامترهای تولید مثلی زالوی شرقی با سه تکرار در سال ۱۳۹۸ صورت گرفته است.

روش‌ها: در هر تکرار تعداد ۱۰ پیش مولد در یک دوره ۵ ماهه پرورش داده شد و در طی این مدت یک‌بار تغذیه شدند. در پایان دوره، تعداد پيله‌ها و لاروهای خارج شده شمارش شده و خصوصیات طول، وزن و قطر پيله‌ها اندازه‌گیری شدند.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که در پارامترهای رشد کم‌ترین و بیش‌ترین مقدار وزن نهایی مولدین پس از تغذیه، درصد افزایش وزن بدن و ضریب رشد ویژه به ترتیب در گروه آزمایشی خون مرغ (۳/۰۶، ۴۶۱/۵، ۰/۰۸۶) و خون اسب (۵/۲۲، ۸۵۷/۲، ۰/۱۱۳) بوده است ($p < 0.05$). بررسی پارامترهای تولید مثلی نشان داد که کم‌ترین و بیش‌ترین مقدار وزن، قطر و طول پيله‌ها به ترتیب در گروه آزمایشی خون مرغ (۰/۲۰۵، ۰/۶ و ۰/۶ و خون اسب (۰/۷۸۵، ۱/۱۶ و ۱/۵) بوده است ($p < 0.05$). بررسی میزان پروتئین کل در خون گاو و اسب نیز نشان داد که تقریباً در محدوده مقدار استاندارد قرار دارد.

نتیجه‌گیری: براساس نتیجه این آزمایش و با توجه به پارامترهای مورد بررسی، خون اسب و گاو دارای بهترین عملکرد تولید مثلی بوده و خون گوسفند و مرغ به دلیل عدم تولد نوزاد از پيله‌های تولید شده، منابع غذایی مناسبی برای تکثیر و پرورش زالوی شرقی نمی‌باشند.

کلیدواژه‌ها: پارامترهای رشد، تفریخ پيله، منابع خونی.

۱- مقدمه

زالوها از شاخه *Annelida* و رده *Clitellata* هستند که به طور گسترده در سراسر جهان در زیستگاه‌های مختلف مانند آب‌های شیرین، دریاها و مناطق بیابانی یافت می‌شوند [1]. در اکوسیستم‌های آبی، گونه‌های مختلف زالو می‌توانند به عنوان شکارچی، انگل گونه‌های آبی دیگر و حتی به عنوان منبع غذایی سایر جانوران آبی نقش داشته باشند [2]. در سال‌های اخیر جمعیت برخی از زالوها به خصوص در اروپا و آسیا به دلیل بهره‌برداری بیش از حد برای طعمه ماهی‌ها، با اهداف پزشکی [3] و یا به دلیل آلودگی شدید زیستگاه‌های آبی [4] به طور چشمگیری کاهش یافته است. امروزه، محصولات زیادی با اهداف پزشکی و دارویی از برخی گونه‌های جنس *Hirudo spp.* در دنیا استحصال می‌شود و به همین منظور برای استفاده بالینی و طب سنتی، مطالعات علمی در زمینه تکثیر و پرورش این گونه‌ها در بسیاری از کشورها در حال افزایش است [1]. به طور کلی، از زالوها

به‌عنوان یک گونه مدل و شاخص در مطالعات سم‌شناسی، فیزیولوژی، زیست‌شناسی عصبی^۱، بیوشیمیایی، بافت‌شناسی و بسیاری از مطالعات دیگر در سطح گسترده‌ای استفاده می‌شوند [5].

خون‌خواری در زالوهایی مثل زالوی شرقی که از خون موجودات زنده مهره‌دار و همولف بی‌مهرگان تغذیه می‌کنند به صورت پیوسته نیست، ولی در هر بار تغذیه مقدار زیادی خون مصرف می‌کنند [6]. هضم خون طی چندین هفته و به طور عمده در روده انجام می‌شود. گلبول‌های خونی بلع شده در چینه‌دان ذخیره شده و علی‌رغم توانایی باکتری‌ها در همولیز کردن آن‌ها، برای مدت طولانی تا ۶ ماه دست نخورده باقی می‌ماند [7]. در دستگاه گوارش تمامی زالوهای طبی مانند *Hirudo orientalis*، *Hirudo medicinalis*، *Hirudo verbena* باکتری‌های *Aeromonas* و *Bacteroidetes* جمعیت غالب را تشکیل می‌دهند که ارتباط تنگاتنگی با گونه‌های مختلف زالو دارند. این باکتری‌ها بخصوص باکتری‌های *Aeromonas* می‌توانند به راحتی در طیف وسیعی از محیط‌ها شامل دستگاه گوارش برخی ماهیان یا حتی در برخی محیط‌های آبی به صورت آزاد زندگی کنند. زمان ورود این باکتری‌ها به بدن زالو، زمان پيله‌گذاری می‌باشد [8]. بررسی‌ها نشان داده که ارتباط بین زالو و باکتری‌های هم‌زیست فراتر از رابطه هم‌زیستی بوده و برقراری تعادل بین آن‌ها، کنترل‌کننده بسیاری از فعالیت‌های آن‌ها است.

زالو توانایی بسیار زیادی در تولید بزاق دارد، به‌طوری‌که، در زمان تغذیه، وقتی به میزبان می‌چسبد بزاق مترشحه از زیر بدن زالو سرازیر می‌شود. بزاق حاوی یک ماده ضد انعقاد به نام هیرودین^۲ است که توانایی زیادی در جلوگیری از انعقاد خون دارد. چند قطره بزاق زالو قادر است مقدار زیادی خون را به صورت مایع نگه دارد و مانع انعقاد آن شود [9].

خون منبع غنی از پروتئین به ویژه آلبومین است و کاتابولیسم خون تغلیظ شده در چینه‌دان زالو بوسیله باکتری‌های هم‌زیست انجام شده و پروتئین موجود در خون، اصلی‌ترین ماده غذایی این باکتری‌ها می‌باشد. علاوه بر آن، همولیز شدن سلول‌های خونی موجب فراهم شدن مقادیر قابل توجهی از منابع لیپیدی در دستگاه گوارش زالو خواهد شد. باکتری *A. veronii*، اسیدهای چرب کوتاه زنجیر از قبیل استات و ترکیبات حاصل از بتاکسیداسیون اسیدهای چرب را مصرف و جمعیت غالب می‌شود [10]. با وجود سرشار بودن خون از مواد غذایی پرانرژی، اما از لحاظ ویتامین‌های گروه B فقیر است ولی باکتری‌ها قادرند این ویتامین‌ها را تولید و در اختیار زالو قرار دهند [11].

علی‌رغم پیشینه تاریخی و جایگاه ویژه زالودرمانی در طب سنتی ایران، تکثیر و پرورش زالو به عنوان یک صنعت نوظهور شناخته شده و با ورود علاقمندان زیاد به این صنعت، هم‌چنان مشکلات عدیدی در بخش‌های مختلف آن مشاهده می‌شود. منشاء این مشکلات، ضعف دانش پایه به دلیل نوپدید بودن این صنعت و اتکا تولیدکنندگان به دستاوردهای تجربی بوده است. با وجود اهمیت این دستاوردها و حیاتی بودن آن در شکل‌گیری صنعت زالو در کشور، ارائه آمارهای متفاوت و از طرفی حصول نتایج متناقض در بخش‌های مختلف تکثیر، پرورش، بهداشت و بیماری و مدیریت به دلیل فقدان پشتیبانی علمی و تحقیقاتی موجب سردرگمی و گمراهی تولیدکنندگان شده است [3]، [4]، [12-19]. تاکنون ۲۲ گونه متعلق به ۱۴ جنس و ۶ خانواده از زالوها در ایران شناسایی شده است [20]. در ایران، اطلاعات کمی از گونه زالوی شرقی *H. orientalis* که پراکنش نسبتاً وسیعی در استان‌های شمالی دارد، وجود دارد، اما به دلیل تقاضای بالا برای مصارف دارویی، از محیط‌های طبیعی به میزان زیاد جمع‌آوری می‌شود که ممکن است جمعیت این گونه را در معرض خطر قرار دهد. اگر چه تاکنون منبع موثقی ادعای فوق را تایید نکرده است، اما شواهد عینی نشان از کاهش آن‌ها در اکوسیستم‌های آبی می‌دهد که استفاده بیش از حد سموم کشاورزی نیز در این امر دخیل است. لذا پرورش این گونه می‌تواند راه‌حل مناسبی برای جلوگیری از کاهش اندازه جمعیت‌های طبیعی یا خطر انقراض آن‌ها باشد [4]. با توجه به این نکته که یکی از عوامل تاثیرگذار بر رشد و تولیدمثل زالوها، تغذیه می‌باشد، به همین منظور در این پژوهش، تاثیر خون مهره‌داران مختلف (مرغ، گاو، گوسفند و اسب) به‌عنوان منبع غذایی روی رشد و کارایی تولیدمثلی زالوی شرقی بررسی شد.

¹ Neurobiologic² Hirudin

۲- مواد و روش‌ها

برای انجام این پژوهش، تعداد ۱۲۰ قطعه زالوی شرقی پیش مولد از مرکز تکثیر و پرورش زالو در منطقه جویبار خریداری و به سالن آکواریوم دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری منتقل شد. برای سازگاری با شرایط جدید قبل از انجام آزمایش، به مدت دو هفته نگهداری شدند. در این آزمایش ۴ گروه آزمایشی مختلف خون شامل اسب، گاو، گوسفند و میغ در ۳ تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی استفاده شده و در هر تکرار ۱۰ قطعه زالوی شرقی پیش مولد قرار داده شد. دمای سالن آزمایش حدود ۲۵ درجه سانتیگراد ثابت بوده و در شرایط تاریکی زالوها پرورش داده شدند و فقط زمان غذادهی در شرایط نور انجام شد. میزان حجم آب به ازای هر قطعه زالو حدود ۲ لیتر بوده که هر ۵ تا ۷ روز یکبار به طور کامل تعویض شد. میزان غذادهی به ازای هر زالو، ۱۰ سی سی از گروه‌های آزمایشی بوده است که کل حجم خونی مورد نیاز بسته به تعداد زالو در هر تکرار درون دستکش‌های لاتکس ریخته و درون آکواریوم‌ها قرار داده شد. بعد از تغذیه پیش مولدین، بسترهای مصنوعی متشکل از خزه‌ها درون هر آکواریوم با همان تراکم اولیه زالوها آماده شد (شکل ۱). خزه‌های جمع‌آوری شده از روی درختان جنگلی را با حجم پوششی کاملاً یکسان درون آکواریوم‌ها قرار داده شد.



شکل ۱- پیله‌گذاری زالوها در بسترهای مصنوعی استفاده شده.

Figure 1- Cocooning of leeches in artificial substrates.

در انتهای دوره آزمایش (پس از ۵ ماه)، تعداد پیله‌های گذاشته شده توسط مولدین در هر تکرار (آکواریوم) و در نهایت تعداد کل نوزادان خارج شده از پیله‌ها نیز جمع‌آوری و شمارش شدند. طول و قطر پیله‌ها به کمک کولیس با دقت ۰/۰۱ میلی متر و وزن اولیه و نهایی (بعد از اتمام تغذیه و قبل از پیله‌گذاری) آن‌ها بوسیله ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱ گرم توزین شدند. برای بررسی پارامترهای رشد از شاخص‌های زیر استفاده گردید.

نسبت تعداد نوزادان به ازای کل پیله براساس رابطه (۱) محاسبه شد [21].

$$\text{Average hatching number} = \frac{\text{number of juveniles}}{\text{cocoons deposited}} \quad (1)$$

درصد افزایش وزن بدن زالوی شرقی تغذیه شده با گروه‌های خونی مختلف براساس رابطه (۲) محاسبه شد [22].

$$\text{WGP} = \frac{BW_f - BW_i}{BW_i} \times 100. \quad (2)$$

WGP: درصد افزایش وزن بدن.

BW_f: وزن نهایی بر حسب گرم.

BW_i: وزن اولیه بر حسب گرم می‌باشد.

ضریب رشد ویژه زالو براساس رابطه زیر محاسبه شد [22].

$$SGR = \frac{\ln W_f - \ln W_i}{t} \quad (۳)$$

$\ln W_f$: لگاریتم طبیعی وزن نهایی بر حسب گرم.

$\ln W_i$: لگاریتم طبیعی وزن اولیه بر حسب گرم.

t: طول دوره پرورش بر حسب روز (از زمان معرفی زالوها به واحدهای آزمایشی تا انتها زمان تغذیه) می‌باشد.

درصد ماندگاری زالوها نیز از نسبت بین تعداد زالوهای زنده در پایان آزمایش به تعداد زالوها در ابتدای آزمایش محاسبه شد [22].

میزان پروتئین کل (گرم بر دسی‌لیتر) در نمونه‌های خونی مختلف با روش بیورت^۱ با کیت پارس آزمون (تهران، ایران) به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر (UNICO, UV/Vis 2150 USA) اندازه‌گیری شد. در محیط قلیایی، پروتئین موجود در سرم با یون‌های مس تشکیل یک کمپلکس آبی مایل به بنفش می‌دهد. شدت رنگ حاصل متناسب با مقدار پروتئین در نمونه است که در طول موج ۵۴۶ نانومتر (۵۶۰-۵۲۰ نانومتر) اندازه‌گیری می‌شود [23].

میزان آلبومین (گرم بر دسی‌لیتر) در نمونه‌های خونی مختلف با روش (Bromocresol Green Method) با کیت پارس آزمون (تهران، ایران) به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر (UNICO, UV/Vis 2150 USA) اندازه‌گیری شد. در محیط اسیدی، آلبومین موجود در سرم با Bromocresol Green یک کمپلکس رنگی سبز-آبی ایجاد می‌کند. شدت رنگ ایجاد شده متناسب با مقدار پروتئین در نمونه است که در طول موج ۵۴۶ نانومتر (۶۰۰-۵۴۰ نانومتر) اندازه‌گیری می‌شود [24].

نرمال بودن داده‌ها براساس روش Shapiro-Wilk بررسی شد. در صورت نرمال بودن داده‌ها برای مقایسه صفات مورد مطالعه در گروه‌های آزمایشی مختلف از آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) استفاده شده و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن استفاده می‌شود. برای تجزیه و تحلیل آماری از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ و برای رسم نمودار از برنامه Excel استفاده شد.

۳- نتایج

نتایج حاصل از تست نرمالیت Shapiro-Wilk نشان داد که تمامی صفات مورد بررسی در سطح خطای ۵٪ نرمال بودند ($p > 0.05$). نتایج حاصل از جدول آنالیز واریانس صفات مورد بررسی نشان داد که به جز قطر پيله‌ها، در بقیه صفات مورد بررسی بین گروه‌های آزمایشی اختلاف معنی‌دار مشاهده شد ($p < 0.05$). براساس جدول آنالیز-واریانس یک‌طرفه، اختلاف معنی‌دار در بین طول پيله‌ها در گروه‌های آزمایشی مختلف مشاهده شد ($p < 0.05$). مقایسه میانگین‌ها براساس آزمون دانکن هم نشان داد که میانگین طول پيله‌ها در گروه‌های آزمایشی تغذیه شده با خون گوسفند و مرغ با گروه‌های آزمایشی تغذیه شده با خون اسب و گاو اختلاف معنی‌داری دارد ($p < 0.05$) (جدول ۱).

جدول ۱- میانگین طول (سانتی‌متر) پيله‌های بدست آمده از زالوی شرقی (H. orientalis) در گروه‌های آزمایشی مختلف.

Table 1. The average length (cm) of cocoons obtained from the H. orientalis in different treatments.

Treatments	Average	Standard Deviation	Min	Max
Cow	1.43 ^b	0.21	1.2	1.6
Sheep	0.9 ^a	0.1	0.8	1
Chicken	0.6 ^a	0.36	0.4	1
Horse	1.5 ^b	0.1	1.4	1.6

Non-identical letters indicate significant differences between treatments.

¹ Biuret Method

بررسی میانگین قطر پیله‌ها در گروه‌های آزمایشی مختلف براساس جدول آنالیز واریانس یک‌طرفه اختلاف معنی‌داری نشان نداد ($p>0.05$). اما مقایسه میانگین‌ها براساس آزمون دانکن نشان داد که بیش‌ترین مقدار قطر پیله‌ها در گروه آزمایشی تغذیه شده با خون اسب مشاهده شد ($p<0.05$) ولی در بقیه گروه‌های آزمایشی مورد مطالعه، اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($p>0.05$) (جدول ۲).

جدول ۲- میانگین قطر (سانتی‌متر) پیله‌های بدست آمده از زالوی شرقی (*H. orientalis*) در گروه‌های آزمایشی مختلف.

Table 2- The average diameter (cm) of cocoons obtained from the *H. orientalis* in different treatments.

Treatments	Average	Standard Deviation	Min	Max
Cow	0.97 ^{ab}	0.21	0.92	1
Sheep	0.8 ^{ab}	0.1	0.7	0.9
Chicken	0.6 ^a	0.36	0.3	1
Horse	1.16 ^b	0.29	0.98	1.56

Non-identical letters indicate significant differences between treatments.

بررسی وزن پیله‌ها در گروه‌های آزمایشی مختلف براساس جدول آنالیز واریانس یک‌طرفه اختلاف معنی‌داری را نشان دادند ($p<0.05$). میانگین وزن پیله‌ها براساس آزمون دانکن، در زالوهای تغذیه شده با خون اسب و مرغ به ترتیب بیش‌ترین و کم‌ترین مقدار را در بین گروه‌های آزمایشی نشان دادند ($p<0.05$) (جدول ۳).

جدول ۳- میانگین وزن (گرم) پیله‌های بدست آمده از زالوی شرقی (*H. orientalis*) در گروه‌های آزمایشی مختلف.

Table 3- The average weight (g) of cocoons obtained from the *H. orientalis* in different treatments.

Treatments	Average	Standard Deviation	Min	Max
Cow	0.387 ^c	0.009	0.378	0.397
Sheep	0.333 ^b	0.004	0.329	0.338
Chicken	0.205 ^a	0.006	0.199	0.211
Horse	0.785 ^d	0.02	0.745	0.785

Non-identical letters indicate significant differences between treatments.

بررسی وزن نهایی زالوهای تغذیه شده با خون‌هایی مختلف براساس جدول آنالیز واریانس اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($p<0.05$). مقایسه میانگین‌ها براساس آزمون دانکن نشان داد که میزان وزن نهایی زالوهای تغذیه شده با خون‌های گوسفند و مرغ تفاوت معنی‌داری با خون‌های گاو و اسب دارد ($p<0.05$). بررسی درصد افزایش وزن زالوهای تغذیه شده با خون‌های مختلف براساس جدول آنالیز واریانس، اختلاف معنی‌داری را بین گروه‌های آزمایشی مختلف نشان داد ($p<0.05$). مقایسه میانگین‌ها براساس آزمون دانکن نشان داد که میزان درصد افزایش وزن زالوهای تغذیه شده با خون‌های گوسفند و مرغ تفاوت معنی‌داری با خون‌های گاو و اسب دارد ($p<0.05$) (جدول ۴).

جدول ۴- میانگین وزن نهایی (گرم) و درصد افزایش وزن بدن زالوهای تغذیه شده با خون‌های مختلف.

Table 4- The average final weight (g) and body weight gain percentage of leeches fed with different bloods.

Treatments	Average Final Weight	Standard Deviation	Min	Max	Percentage of Weight Gain
Cow	4.92 ^b	0.1	4.82	5.02	7.803 ^b
Sheep	3.4 ^a	0.37	3.12	3.82	2.523 ^a
Chicken	3.06 ^a	0.14	2.95	3.22	3.06 ^a
Horse	5.22 ^b	0.15	5.05	5.35	2.857 ^b

Non-identical letters indicate significant differences between treatments.

بررسی شاخص ضریب رشد ویژه زالوهای تغذیه شده با گروه‌های آزمایشی مختلف براساس جدول آنالیز واریانس اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($p<0.05$). مقایسه میانگین‌ها براساس آزمون دانکن، بیش‌ترین و کم‌ترین میزان ضریب رشد ویژه زالوهای تغذیه شده را به ترتیب در خون مرغ و اسب نشان داد ($p<0.05$) (جدول ۵).

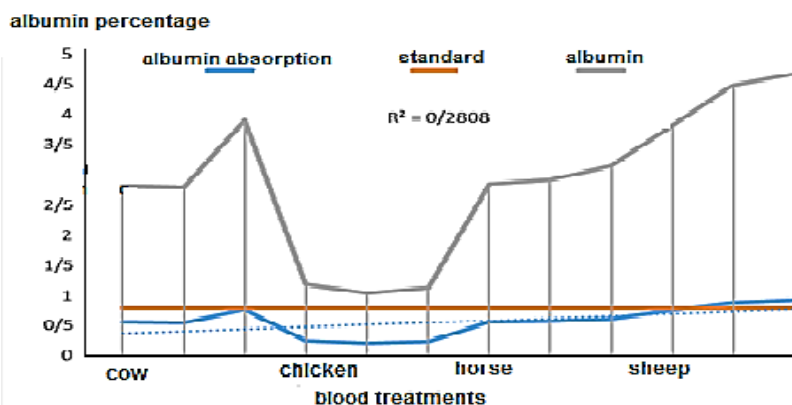
جدول ۵- ضریب رشد ویژه زالوهای تغذیه شده با خون‌های مختلف.

Table 5- Specific growth rate of leeches fed with different blood treatments.

Treatments	Average	Standard deviation	Min	Max
Cow	0.11	0.001	0.109	0.111
Sheep	0.091	0.005	0.087	0.097
Chicken	0.086	0.002	0.089	0.084
Horse	0.113	0.001	0.1113	0.1142

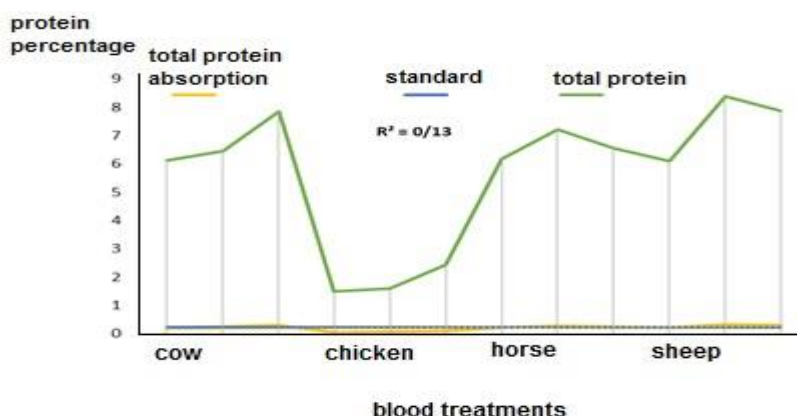
در میزان زنده‌مانی زالوهای پیش‌مولد تغذیه شده با خون‌های مختلف تفاوت چندانی مشاهده نشده است. میزان زنده‌مانی زالوهای تغذیه شده با خون‌های گاو، گوسفند و اسب ۹۳٪ و تغذیه شده با خون مرغ ۹۰٪ بوده است. بررسی میزان نوزادهای خارج شده از پيله‌ها در هر گروه آزمایشی نشان داد که در گروه‌های آزمایشی تغذیه شده با خون گوسفند و مرغ، پيله‌های تولید شده همگی مرده بوده و در این گروه‌های آزمایشی، هیچ بچه زالویی از پيله خارج نشده ولی در زالوهای تغذیه شده با خون اسب و گاو به ترتیب ۲۱ و ۸ بچه زالو از پيله‌ها خارج شده، که میزان تفریخ پيله برای این دو گروه آزمایشی به ترتیب ۲/۳۳ و ۱ می‌باشد.

نتایج بررسی مقدار آلبومین و پروتئین تام یا پروتئین کامل در گروه‌های خونی مختلف نشان داد که آلبومین موجود در خون گوسفند در مقایسه با سایر گروه‌های آزمایشی بیش‌ترین مقدار طول موج جذب شده را دارد. کم‌ترین مقدار آلبومین براساس طول موج جذبی برای گروه آزمایشی مرغ در مقایسه با مقدار استاندارد است. ضریب تعیین برای مقدار آلبومین جذب شده ۰/۲۸ بدست آمد (شکل ۲). درصد مقدار پروتئین تام براساس طول موج قابل جذب در خون گاو و اسب تقریباً در سطح مقدار استاندارد است. میزان پروتئین تام براساس طول موج جذب شده در خون گوسفند بیش‌تر از بقیه گروه‌های آزمایشی است و ضریب تعیین برای مقدار پروتئین تام ۰/۱۳ است. مقدار پروتئین تام براساس طول موج جذب شده در خون مرغ نیز کم‌ترین مقدار را نشان داد (شکل ۳). براین اساس می‌توان گفت که خون مرغ دارای کم‌ترین مقدار پروتئین تام و آلبومین جهت رشد زالو است.



شکل ۲- مقادیر درصد آلبومین براساس طول موج ۵۴۶ نانومتر در چهار گروه خونی مختلف.

Figure 2- Albumin percentage values based on 546 nm wavelength in four different blood groups.



شکل ۳- مقادیر درصد پروتئین کل براساس طول موج ۵۴۶ نانومتر در چهار گروه خونی مختلف.

Figure 3- Total protein percentage values based on 546 nm wavelengths in four different blood groups.

۴- بحث

پرورش زالو در ایران به عنوان یک صنعت نوپا در چند سال اخیر مورد توجه قرار گرفته و بسیاری از مسائل مربوط به تکثیر و پرورش آن در موضوعات مختلف تغذیه، نگهداری، تعداد پيله‌های تولید شده، تعداد بچه‌زالوهای خارج شده از پيله‌ها و غیره ناشناخته بوده و در بسیاری از موارد، اطلاعات ناکافی می‌باشد. البته یکی از مهم‌ترین دلایل آن، اهمیت اقتصادی آن‌هاست که مانع از انتشار دستاوردهای علمی و تجربی می‌گردد [25]. در ضمن، مطالعات کمی در مورد ویژگی‌های تولیدمثلی برخی گونه‌های زالوی جنس *Hirudo* انجام شده و به دلیل کاربرد پزشکی آن‌ها، اکثر مطالعات انجام شده روی گونه *H. medicinalis*، متمرکز شده است [15]. البته روند این مطالعات از سال ۲۰۱۵ تاکنون افزایش یافته است.

در این آزمایش، منابع خونی مورد استفاده در گروه‌های آزمایشی مختلف، خون تازه مهره‌داران بوده است، زیرا پرورش‌دهندگان سنتی زالو معتقدند که خون برخی مهره‌داران بهترین خون در تغذیه زالوها در پارامترهای رشد و تولیدمثل می‌باشد، اما هیچ گزارش مکتوبی در این خصوص مشاهده نشد. ولی نکته قابل تأمل این است که زالوهایی که با خون تازه تغذیه شده‌اند، بیش‌ترین تعداد پيله‌ها را تولید می‌کنند [3].

تعیین شرایط بهینه یک عامل کلیدی در پرورش موفق زالو و تولیدمثل می‌باشد [3]. در گونه‌های مختلف زالو که از خون مهره‌داران تغذیه می‌کنند، نوع خون تغذیه شده بر بسیاری از شاخص‌های رشد و تولیدمثل زالوها موثر می‌باشد اما تأثیر نوع خون تغذیه شده بر شاخص‌های فراوانی نسبی زالوهای تولیدکننده پيله، تعداد پيله‌ها، تعداد بچه زالوهای خارج شده از پيله‌ها و میزان زنده‌مانی در گونه‌های مختلف زالوها، متفاوت بوده است [25]؛ به‌طوری‌که در مطالعه پتراوسکین و همکاران [25]، روی سه گونه *H. medicinalis*، *H. orientalis*، *H. verbana* بیش‌ترین باروری در گونه *H. verbana* و کم‌ترین باروری در گونه *H. medicinalis* مشاهده شده است. همچنین گونه *H. orientalis* دارای باروری و تفریح پيله متوسط بوده که الگوی تولیدمثلی متفاوتی را نشان می‌دهد. این دو الگوی متفاوت تولیدمثل و رشد تا حدود زیادی به نوع استراتژی تولیدمثل گونه‌های مختلف مرتبط می‌باشد [25]، [26]. به‌طوری‌که استراتژی تولیدمثل در گونه *H. verbana* از نوع r و در گونه *H. medicinalis* از نوع k می‌باشد و گونه زالوی شرقی *H. orientalis* دارای استراتژی بینابینی است [25].

در این مطالعه، تعداد پيله‌های تولید شده در زالوهای تغذیه شده با خون اسب و گاو نسبت به گروه‌های آزمایشی دیگر بیش‌ترین بوده است، به‌طوری‌که در زالوهای تغذیه شده با خون اسب یک پيله به ازای هر تکرار تولید شد؛ در حالی‌که در مطالعه عبدالکاری و همکاران [3] تعداد پيله‌های تولید شده در زالوهای جنس *Hirudinea* تغذیه شده با خون مارماهی، ۶ پيله در هر تکرار بوده ولی اندازه نسبتاً کوچک‌تری دارند، که افزایش چند برابری تعداد پيله‌های تولید شده در این مطالعه، به شرایط آزمایش، نوع خون تغذیه شده و استفاده از پارامترهای محیطی مثل میزان نور و دما بستگی دارد [3]. ژانگ و همکاران [27] معتقدند کوچک بودن پيله‌های تولید شده در گونه‌های مختلف زالو به رقابت غذایی و مکان مناسب تولیدمثل ارتباط دارد [27].

در این مطالعه نسبت طول به قطر پيله‌ها بسیار متغیر بوده است و از ۰/۳۳ در زالوهای تغذیه شده با خون مرغ تا ۱/۷۴ در زالوهای تغذیه شده با خون گاو در نوسان بوده است که نسبت به نتایج کیلن و همکاران [15] روی پيله‌های گونه *H. verbana* مطابقت دارد، اما مقدار عددی این نسبت در مطالعه حاضر کمتر است. رابطه همبستگی بین این نسبت و طول پيله‌ها معنی‌دار و مثبت بوده که نشان می‌دهد پيله‌های دارای طول بزرگ‌تر، استوانه‌ای شکل هستند. مقایسه این نسبت بین گونه‌های مختلف زالو نشان داده که میزان استوانه‌ای شکل بودن پيله‌ها به ترتیب در گونه‌های *H. medicinalis*، *H. orientalis*، *verbana* مشاهده شده است [15]، [28]. تعیین رابطه معنی‌داری بین وزن زالوی مولد با وزن، طول و قطر پيله به پیش‌بینی‌های این صفات در زالوهای خارج شده از پيله‌های جمع‌آوری شده از طبیعت کمک می‌کند [15].

میانگین وزن زالوی شرقی (*H. orientalis*) بالغ قبل از پيله‌گذاری در گروه‌های آزمایشی مختلف (مرغ، گاو، گوسفند و اسب) با نتایج دیویس و مک لافلین [29] بر روی گونه *H. medicinalis* و پتراوسکین و همکاران [25] بر روی گونه *H. orientalis* تفاوت نسبتاً زیادی داشته است. مقایسه تعداد پيله‌ها به ازای هر زالو در مطالعه حاضر با نتایج سایر محققین بر روی گونه زالوی شرقی و حتی سایر گونه‌ها تفاوت قابل توجهی دارد؛ همچنین این تفاوت‌ها در تعداد بچه‌زالوهای خارج شده از پيله‌ها و زالوهای مولد نیز با نتایج سایر محققین تفاوت بسیار زیادی داشته است. علت این تفاوت می‌تواند کوچک بودن مولدین در این تحقیق نسبت به مطالعات دیگر [15]، تفاوت شرایط تغذیه‌ای و شرایط محیط پرورش نسبت داد. الیوت و ساویر [30] معتقد است این تغییرات احتمالاً ناشی از اختلاف اندازه جنین و رقابت در مصرف آلبومین در درون پيله‌ها است. علاوه بر این، بعد از

دوره تفریخ پیله، علی‌رغم این‌که پیله‌ها باز شد و آلبومین کاملاً مصرف شد، اما اکثر بچه‌زالوها، پیله‌ها را ترک نکرده و احتمالاً در تعداد بچه‌زالوها محاسبه نشدند.

جدول ۶- مقایسه پارامترهای مختلف رشد و تولیدمثل در مطالعه حاضر با تحقیقات گذشته.

Table 6- Comparison of different growth and reproduction parameters of the present study with past researches.

Parameters	The Present Study with Different Blood Groups			Ceylan et al. [15]	Davies and McLoughlin [29]		Utevskaia and Atramentova [32]	Petrauskienė [25]
Species	<i>H. orientalis</i>			<i>H. verbana</i>	<i>H. medicinalis</i>		<i>H. medicinalis</i>	<i>H. orientalis</i>
Blood	chicken	cow	sheep	horse	-	-	-	-
Wal (g)	3.06	4.29	3.4	5.22	5.7	8.14	-	3.8
	2.95-3.22	4.28-5.02	3.12-3.82	5.05-5.35	1.85-15.11	3-13.8		
Ncpl	0.07	0.28	0.25	0.32	3.2(1-7)	3.1	4.3(1-9)	3.07
Cw (g)	0.205	0.387	0.334	0.765	0.93			
Cl (mm)	7.7	14.3	9	15	21.44			
Cd (mm)	6	9.7	8	11.6	13.81			
Rcld	1.28	1.47	1.12	1.3	1.55			
Nlpc	0.0	1	0.0	2.33	12.29(1-23)	3.9(0-14)	10.9(2-26)	8.55
Nlpl	0.0	0.28	0.0	0.75	37.92(5-103)	11.2	-	26.29

Wal: Weight of adult leeches, Ncpl: Number of cocoons per leech, Cw: Cocoon weight, Cl: Cocoon length, Cd: Cocoon diameter, Rcld: Ratio of cocoon length to diameter, Nlpc: Number of larvae per cocoon, Nlpl: Number of larvae per leech.

بازده تولیدمثل گونه‌های مختلف زالو با وزن آن‌ها کاملاً مرتبط است. فراوانی پیله‌گذاری، تعداد پیله‌ها، وزن و طول پیله‌ها، تعداد پیله‌های تفریخ شده، وزن بچه زالوها به طور مستقیم یا غیرمستقیم با وزن زالوی مولد و بالغ مرتبط است. براساس داده‌های به دست آمده و تجزیه و تحلیل آماری آن‌ها، تصور می‌شود که این داده‌ها می‌تواند در بهبود روش‌های تولیدمثل مصنوعی گونه‌های مختلف زالو از جمله زالوی شرقی *H. orientalis* استفاده شود. گونه‌های مختلف زالو، در میزان رشد و مرگ و میر نیز متفاوت هستند. براساس مطالعات پتراسکین و همکاران [25] گونه *H. verbana* بیش‌ترین تفریخ پیله و کم‌ترین زنده‌مانی را داشته، اما سرعت رشد آن در بین سه گونه زالوی طبی، بالاترین مقدار بوده است. در مطالعه حاضر مقدار پیله‌گذاری گونه *H. orientalis* نسبت به سایر مطالعات انجام شده روی این گونه یا سایر گونه‌های طبی، کم‌ترین مقدار بوده است. اما در مطالعه حاضر، میزان زنده‌مانی این گونه در بین گروه‌های تغذیه شده با خون‌های مختلف و همچنین نسبت به برخی مطالعات انجام شده در مورد گونه‌های مختلف طبی تفاوت چندانی مشاهده نشد.

۵- نتیجه‌گیری

با توجه به اطلاعات علمی منتشر شده کمی که در مورد زالوی شرقی *H. orientalis* وجود دارد و دیدگاه پرورش‌دهندگان که معتقدند خون پستانداران مختلف اثرات متفاوتی روی پارامترهای رشد و تولیدمثل زالوها دارد. لذا در این مطالعه از خون مرغ، گاو، گوسفند و اسب برای تغذیه پیش‌مولدین این گونه استفاده شد. نتایج این مطالعه نشان داد پارامترهای رشد و تولیدمثل در زالوهای تغذیه شده با خون مرغ کم‌ترین مقدار بوده و برای تکثیر و پرورش زالوی شرقی مناسب نمی‌باشد. گروه‌های آزمایشی خون اسب و گاو در بسیاری از پارامترهای مربوط به رشد زالوها بهترین عملکرد را داشتند، اما در مورد پارامترهای تولیدمثلی خون اسب بهتر از خون گاو بوده است.

سپاسگزاری

مقاله حاضر، برگرفته از پایان‌نامه مقطع کارشناسی ارشد در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری می‌باشد. به این وسیله، نویسندگان مقاله از مسئولان دانشگاه و تمام عزیزانی که در انجام این تحقیق همکاری داشته‌اند تشکر و قدردانی می‌نمایند.

عدم تعارض منافع

به این وسیله کلیه نویسندگان مقاله عدم تعارض منافع در رابطه با انتشار مقاله فوق را اعلام می‌دارند.

منابع

- [1] Gouda, H. A. (2006). The effect of peritrich ciliates on some freshwater leeches from Assiut, Egypt. *Journal of invertebrate pathology*, 93(3), 143–149. DOI:10.1016/j.jip.2006.06.005
- [2] Keim, A. (1993). Studies on the host specificity of the medicinal blood leech *Hirudo medicinalis* L. *Parasitology research*, 79(3), 251–255. DOI:10.1007/BF00931901
- [3] Kari, Z. A., Jamaludin, M. H., Wei, L. S., Andu, Y., Ibrahim, W., Izuddin, W. A., & Shazani, S. (2015). Effect of broodstock density on reproduction and juvenile culture of green buffalo leech, *Hirudinea manillensis*. *Songklanakarin journal of science & technology*, 37(5), 581–585.
- [4] Darabi-Darestani, K., & Malek, M. (2011). Seasonal variation in the occurrence of the medicinal leech *Hirudo orientalis* in Guilan Province, Iran. *Aquatic biology*, 11(3), 289–294. DOI:10.3354/ab00310
- [5] Petrauskiene, L. (2004). The medicinal leech as a convenient tool for water toxicity assessment. *Environmental toxicology*, 19(4), 336–341. DOI:10.1002/tox.20039
- [6] Mory, R. N., Mindell, D., & Bloom, D. A. (2000). The leech and the physician: biology, etymology, and medical practice with *Hirudinea medicinalis*. *World journal of surgery*, 24(7), 878–883. DOI:10.1007/s002680010141
- [7] Wenning, A., & Cahill, M. A. (1989). Structural and ultrastructural features of the inlet and outlet regions of the urinary bladders of the leech, *Hirudo medicinalis* L. *Journal of morphology*, 201(3), 285–291. DOI:10.1002/jmor.1052010307
- [8] Whitaker, I. S., Maltz, M., Siddall, M. E., & Graf, J. (2014). Characterization of the digestive tract microbiota of *hirudo orientalis* (Medicinal Leech) and antibiotic resistance profile. *Plastic and reconstructive surgery*, 133(3), 408e–418e. DOI:10.1097/01.prs.0000438461.06217.bb
- [9] Asadi Samani, H., Fatima, Q., Farmer, O., & Poria, R. (2017). Investigating the effect of leech therapy on cardiovascular diseases. *National student conference of medicinal plants and complementary medicine*. Civilica. (In Persian). <https://civilica.com/doc/921139/>
- [10] Bomar, L., Maltz, M., Colston, S., & Graf, J. (2011). Directed culturing of microorganisms using metatranscriptomics. *MBio*, 2(2), 10–1128. DOI:10.1128/mBio.00012-11
- [11] Manzano-Marín, A., Ocegüera-Figueroa, A., Latorre, A., Jiménez-García, L. F., & Moya, A. (2015). Solving a bloody mess: B-vitamin independent metabolic convergence among gammaproteobacterial obligate endosymbionts from blood-feeding arthropods and the Leech *haementeria officinalis*. *Genome biology and evolution*, 7(10), 2871–2884. DOI:10.1093/gbe/evv188
- [12] Zulhisyam, A. K., Ismail, A. A., & Omar, I. C. (2011). Optimization of growth conditions of *Hirudinea* sp. *Australian journal of basic and applied sciences*, 5(3), 268–275.
- [13] Ceylan, M., & Ertatur, İ. (2013). A study on the nutrition of medicinal leech (*Hirudo verbana* Carena, 1820): cannibalism? *Journal of fisheries and aquatic sciences*, 29(4), 167–170. DOI:10.12714/egejfas.2012.29.4.03
- [14] Darabi-Darestani, K., Sari, A., Utevsky, O., & Utevsky, S. Y. (2016). Coloration pattern in populations of the eastern medicinal leech, *Hirudo orientalis* Utevsky & Trontelj, 2005 (Clitellata, Hirudinida): geographical distribution and life history. *Zoomorphology*, 135(3), 291–303. DOI:10.1007/s00435-016-0316-9
- [15] Ceylan, M., Çetinkaya, O., Küçükçara, R., & Akçimen, U. (2015). Reproduction efficiency of the medicinal leech *Hirudo verbana* Carena, 1820. *Turkish journal of fisheries and aquatic sciences*, 15(3), 411–418. DOI:10.4194/1303-2712-v15_2_27
- [16] Ceylan, M., Küçükçara, R., Akçimen, U., & Yener, O. (2017). Reproduction efficiency of the horse leech, *haemopsis sanguisuga*. *Invertebrate reproduction and development*, 61(3), 182–188. DOI:10.1080/07924259.2017.1318096
- [17] Ceylan, M., Küçükçara, R., & Akçimen, U. (2019). Effects of broodstock density on reproduction efficiency and survival of southern medicinal leech, *Hirudo verbana* Carena, 1820. *Aquaculture*, 498, 279–284. DOI:10.1016/j.aquaculture.2018.08.016
- [18] Malek, M., Jafarifar, F., Roohi Aminjan, A., Salehi, H., & Parsa, H. (2019). Culture of a new medicinal leech: growth, survival and reproduction of *Hirudo orientalis* Utevsky and Trontelj, 2005 under laboratory conditions. *Journal of natural history*, 53(11–12), 627–637. DOI:10.1080/00222933.2019.1597200
- [19] Manav, M., Ceylan, M., & Büyükçapar, H. M. (2019). Investigation of reproductive efficiency, growth performance and survival of the southern medicinal leech, *Hirudo verbana* Carena, 1820 fed with mammalian and poultry blood. *Animal reproduction science*, 206, 27–37. DOI:10.1016/j.anireprosci.2019.05.004
- [20] Darabi-Darestani, K., Sari, A., & Sarafrazi, A. (2016). Five new records and an annotated checklist of the leeches (Annelida: Hirudinida) of Iran. *Zootaxa*, 4170(1), 41–70. DOI:10.11646/zootaxa.4170.1.2
- [21] Yasumaru, F., & Lemos, D. (2014). Species specific in vitro protein digestion (pH-stat) for fish: method development and application for juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), cobia (*Rachycentron canadum*), and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 426–427, 74–84. DOI:10.1016/j.aquaculture.2014.01.012
- [22] Helland, S. J., Grisdale-Helland, B., & Nerland, S. (1996). A simple method for the measurement of daily feed intake of groups of fish in tanks. *Aquaculture*, 139(1–2), 157–163. DOI:10.1016/0044-8486(95)01145-5
- [23] Garg, V. K., Chand, S., Chhillar, A., & Yadav, A. (2005). Growth and reproduction of *Eisenia foetida* in various animal wastes during vermicomposting. *Applied ecology and environmental research*, 3(2), 51–59. DOI:10.15666/aer/0302_051059
- [24] Bilton, H. T., & Robins, G. L. (1973). The effects of starvation and subsequent feeding on survival and growth of Fulton channel sockeye salmon fry (*Oncorhynchus nerka*). *Journal of the fisheries board of canada*, 30(1), 1–5.

- [25] Chahardehi, M. Y., Nikishov, A. A., & Abtahi, B. (2016). Effects of different maintenance systems and density on behavioral responses of young european medicinal leeches, *Hirudo medicinalis*. *Journal of plasma and biomarkers*, 9(2), 33-38. (In Persian). <https://www.magiran.com/paper/1564108>
- [26] Petrauskiene, L., Utevska, O., & Utevsky, S. (2011). Reproductive biology and ecological strategies of three species of medicinal leeches (genus *Hirudo*). *Journal of natural history*, 45(11-12), 737-747. DOI:10.1080/00222933.2010.535918
- [27] Utevsky, S., Zagmajster, M., & Trontelj, P. (2014). *Hirudo medicinalis*. *The iucn red list of threatened species*, 2014, 2011-2014. <https://www.gbif.org/species/176727238>
- [28] Zhang, B., Lin, Q., Lin, J., Chu, X., & Lu, J. (2008). Effects of broodstock density and diet on reproduction and juvenile culture of the leech, *Hirudinaria manillensis* Lesson, 1842. *Aquaculture*, 276(1-4), 198-204.
- [29] Maitland, P. S., Phillips, D. S., & Gaywood, M. J. (2000). Notes on distinguishing the cocoons and the juveniles of *hirudo medicinalis* and *haemopsis sanguisuga* (hirudinea). *Journal of natural history*, 34(5), 685-692. DOI:10.1080/002229300299354
- [30] Davies, R. W., & McLoughlin, N. J. (1996). The effects of feeding regime on the growth and reproduction of the medicinal leech *Hirudo medicinalis*. *Freshwater biology*, 36(3), 563-568. DOI:10.1046/j.1365-2427.1996.00121.x
- [31] Elliott, J. M., & Sawyer, R. T. (1987). Leech Biology and Behaviour. *The journal of animal ecology*, 56(2), 720. DOI:10.2307/5083
- [32] Utevska, O. M., & Atramentova, L. A. (2003). ANOVA designs for estimating heritability of reproductive traits in medicinal leech *Hirudo medicinalis* L. *Russian journal of genetics*, 39(10), 1208-1213. DOI:10.1023/A:1026191314507



Paper Type: Original Article



Comparison of Diet Composition of Variable Toad *Bufo* *sitibundus* (Amphibia: Anura: Bufonidae), Inside and Outside the Caves in West of Iran

Hamid Darvishnia^{1,*}, Amirarsalan Kavyanifard¹

¹ Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran; darvishnia_h@pnu.ac.ir; Assistant Professor, kavyanifard_aa@pnu.ac.ir.

Citation:

Darvishnia, H., & Kavyanifard, A. (2023). Comparison of diet composition of variable toad *Bufo sitibundus* (amphibia: Anura: Bufonidae), inside and outside the caves in west of Iran. *The quarterly scientific journal of applied biology*, 36(3), 54-62.

Received: 15/10/2022

Accepted: 17/09/2023

Abstract

Introduction: The relatively stable conditions of caves, such as humidity and minimal variation of temperature, provide a suitable place to reproduce, exploit food, and avoid extreme temperatures in some animals, including Anurans, which are considered troglodytes or accidental cave dwellers. Anurans are opportunistic predators that feed upon numerous food resources that are more abundant in their environment.

Methods: The diet of variable toads was investigated and compared between specimens collected inside and outside the caves. Using the stomach flushing technique, a total of 37 specimens of variable toads were flushed, and 469 food items were identified to order or family ranks.

Results: Examination of the stomach contents of toads demonstrated that the diet of the two groups mainly consist of terrestrial insects. The toads outside the cave had a more variable and abundant diet than the specimens examined inside the caves, with orders Hymenoptera (44.89%) and Coleoptera (30.38%) as the first and second highest rank of abundance. Coleoptera (48.45%) and Hymenoptera (13.40%) were the most abundant food items among specimens collected from the caves. The greater variety of food items of toads outside the caves compared to those inside the caves is a reflection of invertebrate communities and abundance in both environments.

Conclusion: The less diversity and abundance of food items in the cave habitat implies a more intense food competition in the cave's unique environment with low energy resources. The presence of various-sized preys among the food items indicates an opportunistic feeding habit in this toad, as well.

Keywords: Accidental cave dweller, Anuran amphibian, Coleoptera, Food items, Terrestrial invertebrates.





مقایسه ترکیب رژیم غذایی وزغ *Bufotes sitibundus* در محیط درون و بیرون از غارها در غرب ایران

حمید درویش‌نیا^{۱*}، امیرارسلان کاویانی‌فرد^۱

^۱گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.

چکیده

مقدمه: شرایط نسبتاً پایدار غارها مانند رطوبت و حداقل تغییرات دما، مکان مناسبی را برای تولیدمثل، کسب غذا و دوری از دمای شدید در برخی حیوانات، از جمله دوزیستان بی‌دم که غار زیان تصادفی محسوب می‌شوند، فراهم می‌کند. دوزیستان بی‌دم شکارچیان فرصت‌طلبی هستند که از منابع غذایی با فراوانی بیشتر در محیط اطرافشان تغذیه می‌کنند.

روش‌ها: در پژوهش حاضر به بررسی رژیم غذایی وزغ (*Bufotes sitibundus* (Pallas, 1771) ساکن محیط غار پرداخته شد و ضمن معرفی این گونه، گزینه‌های غذایی آن‌ها با نمونه‌های مشابه بیرون از محیط غار مورد مقایسه قرار گرفت. محتویات معده ۳۷ نمونه وزغ به روش تخلیه محتویات معده جداسازی و مجموعاً ۴۶۹ گزینه غذایی تا حد راسته یا خانواده شناسایی شدند.

یافته‌ها: بررسی محتویات معده نشان داد که هر دو گروه وزغ اغلب از بندپایان خشکی‌زی تغذیه می‌کنند. وزغ‌های بیرون از محیط غار رژیم غذایی متنوع‌تر و با فراوانی بیشتری را نسبت به نمونه‌های ساکن غار دارا بودند که راسته بال‌غشائیان با ۴۴/۸۹٪ و قاب‌بالان با ۳۰/۳۸٪ دارای بیشترین فراوانی بودند. در نمونه‌های ساکن غار، قاب‌بالان با ۴۸/۴۵٪ و بال‌غشائیان با ۱۳/۴۰٪ دارای بیشترین فراوانی در بین گزینه‌های غذایی بودند. تنوع بیشتر گزینه‌های غذایی وزغ‌های بیرون غار نسبت به نمونه‌های ساکن غار انعکاسی از وضعیت بی‌مهرگان هر دو محیط است.

نتیجه‌گیری: تنوع و فراوانی کمتر گزینه‌های غذایی در محیط غار سبب به‌وجود آمدن رقابت غذایی شدیدتر در محیط منحصربه‌فرد و با منابع انرژی پایین غار است. همچنین وجود طعمه‌هایی با اندازه‌های مختلف در بین گزینه‌های غذایی، نشان‌دهنده یک تغذیه فرصت‌طلبانه در این وزغ می‌باشد.

کلیدواژه‌ها: بی‌مهرگان خشکی‌زی، دوزیست بیدم، غارزی تصادفی، قاب‌بال، گزینه‌های غذایی.

۱- مقدمه

غارها اکوسیستم‌هایی ویژه، با خصوصیات اکولوژیک منحصربه‌فرد هستند. تاریکی مطلق، رطوبت بالا، دمای کم و نسبتاً ثابت و کمبود انرژی و منابع غذایی از جمله خصوصیات محیط غار است که در تمام طول سال تقریباً ثابت می‌باشند [1]. یکی از اصلی‌ترین دلایل کمبود انرژی و منابع غذایی در چنین محیطی، عدم وجود نور است. در غیاب نور هیچ گیاه فتوسنتز کننده‌ای که اساس و پایه هرم غذایی جانداران هستند، رشد نخواهد کرد و این امر حیات تمامی زیندگان یک غار را به هم وابسته‌تر می‌کند چراکه یا خود گونه جانوری، لاشه، مواد دفعی، تخم و یا لارو آن منبع غذایی گونه دیگری می‌شود [2]. منابع انرژی، میزان و کیفیت آن در داخل با بیرون غار متفاوت است. عمده منابع غذایی مورد استفاده در غار به نحوی از

بیرون وارد غار شده‌اند. یکی از منابع مهم انرژی در غارها، گوانوی (فضولات) خفاش‌ها می‌باشد که نقش بسیار مهمی در اکولوژی بسیاری از غارها دارد. بسیاری از موجودات از این منبع تغذیه نموده و بر روی آن کلنی تشکیل می‌دهند. فضولات انواع جانوران دیگر ساکن غار هم چون پرندگان، تشی، جیرجیرک و ...، منبع غذایی مهم دیگری در محیط غار می‌باشند. هم‌چنین در غار، رابطه‌های شکارگری نیز به همان خوبی محیط خارج وجود دارد [2]، [3]. غارها اندازه‌های مختلفی دارند ولی بر اساس ارتباط با محیط بیرون، معمولاً آن‌ها را می‌توان به سه قسمت؛ شامل اندوژن (ناحیه روشن یا ورودی غار)، پاراهپیوژن (ناحیه گرگومیش یا ناحیه میانی غار) و هاپیوژن (ناحیه تاریک یا ناحیه انتهایی غار) تقسیم کرد [4].

گروه‌های جانوری متعددی در غار زندگی می‌کنند که بر اساس نحوه زندگی در غار، سازش با شرایط غار و نحوه طی کردن چرخه زندگی خود به سه گروه تقسیم می‌شوند. گروه اول، غارزیان واقعی (troglobites) هستند که سازش یافته با محیط غار می‌باشند [5]. این گروه از زندگی در بیرون غار ناتوان بوده و چرخه زندگی خود را کاملاً در محیط غار طی می‌کنند. گروه دوم، غارزیان انتخابی (cave lovers or troglaphiles) می‌باشند که غالباً می‌توانند چرخه زندگی خود را در غار کامل کنند اما به زندگی در محیط غار محدود نشده‌اند و می‌توانند در بیرون غار نیز زندگی کنند، مانند انواعی از بندپایان. گروه سوم، غارزیان اتفاقی یا تصادفی (cave guests or troglonexes) هستند که گروه‌های جانوری هم‌چون خفاش‌ها، تشی، پرندگان، خزندگان و انواعی از دوزیستان را شامل می‌شود. این گروه، غارزی واقعی نیستند و صرفاً جهت یافتن غذا، استراحت، فرار از شرایط محیطی (سرما، گرما و شکارچی)، خواب زمستانی یا تولیدمثل و برحسب عادت وارد غار می‌شوند و به‌صورت دوره‌ای به بیرون از غار می‌روند [3]، [4].

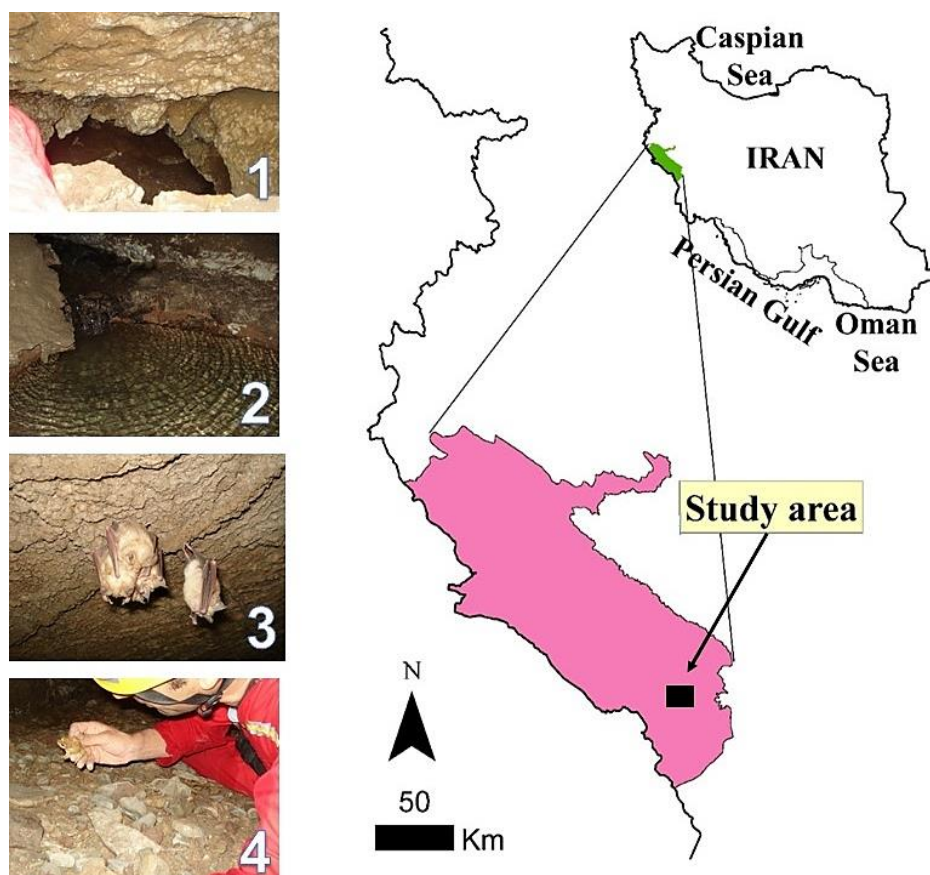
یک گروه از غارزیان اتفاقی، دوزیستانی مثل وزغ‌ها می‌باشند. این جانوران به دلیل تنفس پوستی و حساسیت به گرما؛ باید در محیط‌های مرطوب، دارای سایه و دمای متعادل زندگی کنند [6]. حضور دوزیستان در غارها و زیستگاه‌های زیرزمینی موضوع جدیدی نیست. دوزیستان، غارها و دیگر محیط‌های زیرزمینی را به‌عنوان پناهگاهی برای دوری از گرمای شدید بیرون، تغذیه و به‌عنوان مکانی برای زادوولد به کار می‌برند [7]. تعدادی از سمندرها غارزی واقعی بوده و زندگی آن‌ها محدود به محیط تاریک غار می‌باشد. برخی دوزیستان بی‌دم مانند وزغ‌ها به‌صورت اتفاقی در محیط غار مشاهده می‌شوند [3]. در ناحیه پالئارکتیک، حضور دوزیستانی هم‌چون سمندرها در محیط‌های زیرزمینی نسبتاً عمومیت دارد و گزارش‌هایی از این دوزیستان در محیط‌های زیرزمینی وجود دارد [9] - [7].

در سالیان اخیر عوامل متعددی هم‌چون گرمایش زمین، تغییرات آب و هوایی، تخریب زیستگاه و کاهش منابع آبی سبب کاهش زیستگاه مناسب برای دوزیستان و افزایش سرعت انقراض آن‌ها گردیده است. دوزیستان باید محیطی را برای زندگی انتخاب کنند که دارای آب یا رطوبت کافی بوده تا بدن آن‌ها را در مقابل از دست دادن آب حفاظت نموده و نیز بتوانند غذای خود را شکار نمایند [10]. از راسته دوزیستان بی‌دم، پنج خانواده در ایران وجود دارد. بزرگ‌ترین خانواده در بین آن‌ها، خانواده Bufonidae می‌باشد که طیف گسترده‌ای از زیستگاه‌های گوناگون را اشغال نموده‌اند. وزغ متغیر، *Bufotes sitibundus* متعلق به این خانواده و جنس *Bufotes* می‌باشد. این گونه در نیمه غربی و مرکز ایران پراکنش دارد و در گذشته با نام‌های وزغ سبز و نیز وزغ متغیر (*B. variabilis*) از ایران گزارش شده است. بازنگری‌های فیلوژنتیکی اخیر در جنس *Bufotes* نام *B. sitibundus* را برای وزغ سبز نواحی غربی ایران در نظر می‌گیرد [11]. وزغ‌ها معمولاً از طیف گسترده‌ای از بی‌مهرگانی هم‌چون بندپایان تغذیه می‌کنند که تغذیه آن‌ها انعکاسی از فراوانی طعمه در زیستگاه این گروه می‌باشد [12]. مطالعات گذشته نشان داده که دوزیستان الگوی غذایی متنوعی داشته و از عنکبوت‌ها، دوبالان، مورچه‌ها، قاب‌بالان و لارو حشرات تغذیه می‌کنند [13] - [19]، [6].

دوزیستان به دلیل داشتن نقش شکارگری و اینکه خود به‌عنوان شکار برای سایر شکارچیان به شمار می‌آیند دارای نقش مهمی در چرخه ماده و جریان انرژی هستند. دوزیستان بالغ نیز با تغذیه از حشرات و دیگر بندپایان، نقش مهمی در کنترل بیولوژیک آفات دارند [15]؛ بنابراین داشتن اطلاعاتی از عادات غذایی دوزیستان جهت تعیین اثرات شرایط محیطی و فراوانی گزینه‌های غذایی در مکان زیست آن‌ها بسیار مهم می‌باشد. دمای متعادل و شرایط مرطوب غارهای مورد مطالعه در این پژوهش (به‌ویژه غار گچ زاغ که دارای آب روان می‌باشد)، یک پناهگاه و مکان غذایی مناسب برای وزغ‌ها در شرایط آب و هوایی گرم و خشک منطقه را فراهم آورده است. علیرغم تنوع نسبتاً مناسب وزغ‌ها در ایران، متأسفانه تاکنون مطالعات اندکی درباره جنبه‌های مختلف زیست‌شناسی آن‌ها صورت گرفته است. بدین منظور در این پژوهش ضمن معرفی وجود وزغ *B. sitibundus* در محیط غار برای اولین بار در ایران، الگوی غذایی آن مورد بررسی قرار گرفته و به مقایسه گزینه‌های غذایی این گونه با نمونه‌هایی از محیط بیرون غار پرداخته می‌شود.

۲- مواد و روش‌ها

شهرستان آبدانان با موقعیت ۳۲ درجه و ۵۹ دقیقه طول شرقی و ۴۷ درجه و ۲۵ دقیقه عرض شمالی، در جنوب استان ایلام واقع گردیده است (شکل ۱). این شهرستان منطقه‌ای کوهستانی است که در دامنه‌ی ارتفاعی ۴۴۰ تا ۲۶۰۰ متر از سطح دریا قرار گرفته و دارای اقلیم بیابانی گرم است. متوسط مقدار بارندگی سالانه منطقه، حدود ۲۹۲ میلی‌متر بوده و بیشتر نزولات در منطقه به‌صورت باران می‌باشد. دوره خشکی منطقه حدوداً از اواسط اردیبهشت تا اواخر آبان است. دمای متوسط سالانه منطقه 26°C و میانگین رطوبت نسبی منطقه ۳۸/۸٪ است [20].



شکل ۱- نقشه استان ایلام که موقعیت منطقه مورد مطالعه، با علامت مربع نشان داده شده است (سمت راست). غار گچ زاغ در سمت چپ؛ ۱- نمای ورودی غار ۲- آب داخل غار ۳- خفاش ساکن غار ۴- نمونه‌ای از وزغ مورد مطالعه (*Bufo sitibundus*).

Figure 1- The map of Ilam province, where the location of the studied area is shown with a square symbol (right side). Gach Zagh Cave in left side; 1. entrance view of the cave, 2. water inside the cave, 3. bat living in the cave, 4. a sample of the studied toad (*Bufo sitibundus*).

منطقه مورد مطالعه در رشته‌کوه زاگرس (بخشی از لکه داغ تنوع زیستی ایران-آناطولی) واقع شده است. این رشته‌کوه به دلیل موقعیت جغرافیایی، زمین‌شناسی و شرایط اقلیمی ویژه یکی از مناطق زیستی مهم در جهان و از جمله غنی‌ترین زیست‌بوم‌های ایران از نظر تنوع زیستی می‌باشد [21]. به دلیل شرایط خاص پژوهش روی غارها، ابتدا اطلاعات لازم درباره غارهای مورد مطالعه از گروه‌های غارنوردی، افراد محلی و یا منابع موجود به‌دست آمد و پس از تهیه وسایل مورد نیاز غارنوردی به جمع‌آوری نمونه‌ها پرداخته شد (شکل ۲).

در پژوهش حاضر که در بهار و تابستان ۱۴۰۰ انجام گرفت، محیط بیرون و داخل غارهای گچ زاغ (۳۲ درجه و ۴۰ دقیقه شمالی، ۴۷ درجه و ۳۵ دقیقه شرقی و در ارتفاع ۴۹۰ متر از سطح دریا) و مزاره (۳۲ درجه و ۵۳ دقیقه شمالی، ۴۷ درجه و ۴۱ دقیقه شرقی و در ارتفاع ۹۵۳ متر از سطح دریا) واقع در شهرستان آبدانان، جنوب استان ایلام مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۱ سمت راست). با استفاده از چراغ‌قوه پیشانی و با کمک دست و تور، تعداد ۱۱ نمونه وزغ *Bufo sitibundus* با میانگین وزنی ۳۱-۴۳ گرم و طول پوزه تا منخرن ۶۳-۷۱ میلی‌متر از نواحی اندوژن و پاراهپیوژن

غارهای مورد مطالعه و به منظور مقایسه، ۲۶ نمونه از همین وزغ با میانگین وزنی ۳۳-۴۶ گرم و طول پوزه تا مخرج ۶۵-۷۶ میلی متر از محیط بیرون غارها جمع آوری گردید (شکل ۱ سمت چپ)). علاوه بر گونه وزغ مورد مطالعه، گونه *B. luristanicus* نیز در منطقه مطالعاتی پراکنش دارد. وجه تمایز این دو گونه وزغ از همدیگر وجود غدد پاراتوئید مربعی شکل در وزغ لرستانی و غدد پاراتوئید کشیده در وزغ متغیر است. نمونه های وزغ به صورت زنده در کیسه های پارچه ای مجزا، جهت مطالعه نگه داری شدند و تمام اطلاعات بیومتریکی و مورفومتریکی مربوط به نمونه ها به صورت زنده و با در نظر گرفتن یک کد یادداشت گردید. برای اندازه گیری نمونه ها، از کولیس با دقت ۰/۰۱ میلی متر استفاده شد. به منظور بررسی تغذیه، بلافاصله پس از جمع آوری این وزغ، محتویات معده آن ها به روش شستشوی معده (stomach flushing) نمونه های زنده بر اساس [22]، جمع آوری و برای هر نمونه در ویال های شیشه ای محتوی اتانول ۷۵٪ به صورت مجزا نگه داری شدند. پس از مطالعه، نمونه های وزغ بدون هیچ آسیبی در محیط طبیعی خود در داخل و یا بیرون غار رها شدند.

هم زمان با نمونه برداری، فاکتورهای محیطی غارها و محیط بیرون آن ها از جمله دمای هوا، درصد رطوبت و میزان گاز دی اکسید کربن (CO_2) و هم چنین اسیدیته (pH) و دمای آب (در صورت وجود آب) اندازه گیری شد. تعداد نمونه های جمع آوری شده و فاکتورهای محیطی ثبت شده برای هر غار در جدول ۲ آورده شده است. اطلاعاتی هم چون تاریخ جمع آوری، نام جمع آوری کننده/کنندگان، مختصات جغرافیایی، محل جمع آوری داخل غار، روش جمع آوری، آدرس غار و نیز عکس برداری از محل جمع آوری نمونه ها برای هر غار ثبت گردید. ویال های شیشه ای حاوی گزینه های غذایی هر نمونه، به آزمایشگاه زیست شناسی دانشگاه پیام نور مرکز ایلام منتقل گردید و محتویات معده هر نمونه در زیر استریومیکروسکوپ با یک مقیاس اندازه گیری یکسان مورد بررسی قرار گرفتند. گزینه های غذایی با استفاده از کلیدهای شناسایی معتبر [23]، [24] در حد راسته و در برخی موارد در حد خانواده شناسایی شدند. درصد فراوانی هر راسته ($100 \times$ تعداد کل نمونه های غذایی مشاهده شده/تعداد نمونه های مشاهده شده از آن راسته) و درصد حضور هر راسته در محتویات معده وزغ های بیرون و درون غارها محاسبه گردید.

جدول ۱ - تعداد نمونه های وزغ *Bufotes sitibundus* بررسی شده، تعداد گزینه های غذایی و فاکتورهای محیطی اندازه گیری شده از محیط های داخل غار و بیرون از غار.

Table 1- The number of *Bufotes sitibundus* toad samples examined, the number of food options and environmental factors measured from the environments inside the cave and outside the cave.

Location		Parameters										Specimen	
		Water Acidity		CO2 conc.		Air T.		Water T.		H (%)		Toad#	Food#
		Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max		
Gach-e-zagh Cave	Inside the cave	6.89	7.96	560	594	19.7	23.1	21.9	24.6	69	85	7	61
	Outside the cave	-	-	72	101	25	49	-	-	24	43	21	291
Mazhare Cave	Inside the cave	6.51	7.05	709	911	18.8	21.9	20.8	21.7	71	86	4	36
	Outside the cave	-	-	83	97	23	45	-	-	19	35	5	81

Min: minimum; Max: maximum; conc.: concentration (ppm); T.: temperature ($^{\circ}C$); H (%): Humidity percentage; Toad#: number of toads; Food#: total number of food items

۳- نتایج

در این پژوهش به منظور بررسی گزینه های غذایی دوزیستان داخل غار و محیط بیرون آن، غارهای طبیعی گچ زاغ و مژاره در جنوب استان ایلام مورد بررسی قرار گرفتند و پس از بیومتری، محتویات معده ۳۷ نمونه از وزغ های زنده *B. sitibundus* (۱۱ نمونه از محیط غار و ۲۶ نمونه از محیط بیرون غار) تخلیه شد. سپس نمونه های وزغ زنده بدون هیچ آسیبی به محیط طبیعی زندگی خود بازگردانده شدند. علاوه بر بررسی گزینه های غذایی، کمینه و بیشینه فاکتورهای محیطی غارهای مورد مطالعه، اندازه گیری شد (جدول ۱).

از تعداد ۳۷ وزغ بررسی شده، معده ۵ وزغ (۳ نمونه از محیط غار و ۲ نمونه از محیط بیرون غار) یا خالی از مواد غذایی بود یا دارای محتویات کاملاً هضم شده بودند و بنابراین نیازمند بررسی های دقیق تر بودند. از ۳۲ نمونه وزغ باقی مانده، حداقل یک گزینه ی غذایی در محتویات معده وجود داشت. در مجموع ۴۶۹ گزینه غذایی متعلق به ۱۴ راسته از ۷ رده بی مهرگان و یک راسته از رده مهره داران شناسایی گردید (میانگین $14/31 \pm 0/02$ مورد گزینه غذایی برای نمونه های بیرون غار و $8/81 \pm 2/11$ مورد برای نمونه های وزغ ساکن غار). حشرات با ۷ راسته، متنوع ترین گروه جانوری بودند

که در محتویات معده دوزیست مورد مطالعه یافت شد (جدول ۲). در محتویات معده نمونه‌های وزغ بیرون از غار ۱۴ راسته از بی‌مهرگان و در نمونه‌های داخل غار ۹ راسته از بی‌مهرگان و یک راسته از مهره‌داران جمع‌آوری و مورد شناسایی قرار گرفت (جدول ۲).

جدول ۲- ترکیب رژیم غذایی وزغ *Bufo sitibundus* داخل غار و محیط بیرون از آن.

Table 2- Diet composition of the toad *Bufo sitibundus* inside the cave and the environment outside it.

Identified Animal Category		Inside the Cave			Outside the Cave			The Total Outside and inside of the Cave		
Class	Order	Food#	F.	Atten.	Food#	F.	Atten.	Food#	F.	Atten.
Arachnida	Araneae	5	5.15	44.45	11	2.96	25	16	3.41	32.43
	Acarina	3	3.09	33.33	3	0.80	8.33	6	1.28	16.21
Malacostraca	Isopoda	5	5.15	22.22	9	2.42	20.83	14	2.98	21.62
	Collembola	9	9.28	77.78	7	1.88	12.50	16	3.41	31.08
Insecta	Orthoptera	-	-	-	9	2.42	20.83	9	1.91	13.50
	Dermaptera	-	-	-	6	1.61	16.70	6	1.28	11.73
	Blattodea	3	3.09	11.12	9	2.42	16.70	12	2.56	15.03
	Coleoptera	47	48.45	88.89	113	30.38	95.83	160	34.11	94.60
	Hymenoptera	13	13.40	55.56	167	44.89	87.50	180	38.38	77.97
	Diptera	-	-	-	8	2.15	25	8	1.70	17.56
Myriapoda	Chilopoda	9	9.28	77.78	4	1.07	16.70	13	2.77	35.14
	Diplopoda	2	2.06	22.22	10	2.69	29.16	12	2.56	27.02
Clitellata	Oligochaeta	-	-	-	7	1.88	20.83	7	1.49	14.63
Gastropoda	Snails	-	-	-	9	2.42	29.17	9	1.91	20.48
Amphibia	Anura (tadpoles)	1	1.03	11.12	-	-	-	1	0.21	3.30
Total number of food items		97			372			469		
Vegetal fragments		3			17			20		
The remains of the insects's molt		1			5			6		
Sand grains		7			21			28		
Unidentifiable digested materials		7			23			30		

F.: Frequency; Atten.: Attendance percentage; Food#: number of food items

الگوی غذایی نمونه وزغ مورد مطالعه، متنوع بود و علاوه بر نمونه‌های بی‌مهره، یک نمونه مهره‌دار، بقایای گیاهی، بقایای پوست‌اندازی حشرات، سنگ‌ریزه و نمونه‌های هضم شده غیرقابل تشخیص از محتویات معده گونه وزغ جمع‌آوری و مورد شناسایی قرار گرفت. قاب بالان (Coleoptera)، بال‌غشائیان (Hymenoptera)، هزارپایان (Diplopoda) و دم‌فنی‌ها (Collembola) به ترتیب با ۴۸/۴۵٪، ۱۳/۴۰٪، ۹/۲۸٪ و ۹/۲۸٪ گزینه غذایی غالب وزغ‌های ساکن غار و مورچه‌ها (Formicidae) متعلق به بال‌غشائیان، قاب بالان و عنکبوت‌ها (Araneae) به ترتیب با ۴۴/۸۹٪، ۳۰/۳۸٪ و ۲/۹۶٪ گزینه غذایی غالب وزغ‌های جمع‌آوری شده از محیط بیرون از غار بود. در مجموع دو محیط، نمونه‌های راسته بال‌غشائیان (که اغلب مورچه بودند) بیشترین فراوانی گزینه‌های غذایی را به خود اختصاص دادند و به دنبال آن قاب بالان و دم‌فنی‌ها دارای بیشترین فراوانی در بین گزینه‌های غذایی محتویات معده وزغ بودند. از مهره‌داران فقط یک عدد لارو مربوط به دوزیستان بی‌دم در محتویات معده وزغ ساکن دهانه ورودی غار گچ زاغ به دست آمد. سایر گروه‌های بی‌مهرگان با درصد پایین‌تری در محتویات معده وزغ‌ها مشاهده شدند.

از لحاظ اندازه بدن در گزینه‌های شکار شده توسط وزغ‌ها، اغلب نمونه‌های شناسایی شده متعلق به بندپایان با جثه متوسط بودند، به دنبال آن بی‌مهرگان ریز جثه قرار داشتند و کمترین فراوانی مربوط به نمونه‌های بندپایان با جثه بزرگ بودند. تمامی نمونه‌های بی‌مهره، متعلق به انواع خشکی‌زی بودند که علاوه بر بندپایان می‌توان به نرم‌تنان (حلزون‌ها) و آلودها (کرم‌های خاکی) نیز اشاره نمود. مجموعاً ۲۰ قطعه گیاهی، ۶ عدد بقایای پوست‌اندازی حشرات، ۲۸ عدد سنگ‌ریزه و ۳۰ نمونه هضم شده غیرقابل شناسایی از محتویات معده وزغ‌ها جمع‌آوری شد که به تفکیک محیط جمع‌آوری در جدول ۲ آورده شده است.

ترکیب غذایی وزغ‌های محیط بیرون غار شامل طیف گسترده‌تری از راسته‌های مختلف جانوری بود، اما در وزغ‌های ساکن غار تعداد محدودتری از راسته‌های جانوری و با فراوانی کمتر در ترکیب غذایی آن‌ها وجود داشت. از نظر استفاده از گزینه غذایی اختصاصی، تفاوتی بین نمونه‌های بیرون

غار با داخل غار مشاهده نشد. میانگین تعداد گزینه‌های غذایی برای هر معده در نمونه‌های بیرون از غار بیشتر از نمونه‌های داخل غار بود. در وزغ‌های بیرون از محیط غار تعدادی گزینه غذایی پروازگر مثل اعضای راسته‌های دوبالان (Diptera) و راست‌بالان (Orthoptera) نیز وجود داشت. هم‌چنین نمونه‌های بیرون غار عمدتاً از گزینه‌های غذایی با جثه متوسط تا درشت جثه تغذیه کرده بودند اما تغذیه وزغ‌های بررسی شده در محیط غار اغلب از گزینه‌های غذایی با جثه ریز تا متوسط بود.

۴- بحث

تاکنون اطلاعاتی درباره ترکیب غذایی وزغ‌های ساکن غارها و مقایسه آن با جمعیت بیرون از غار به دست نیامده است. البته در سال‌های اخیر مطالعاتی در مورد ترکیب غذایی انواعی از دوزیستان بی‌دم، در محیط بیرون از غار انجام شده که می‌توان به مطالعه چیکک و مرمر [25]، کیدرا و همکاران [14]، کرنبرنجا-ایزایلوویچ و همکاران [26]، سیکورت لوساسیا و همکاران [27]، نروال و همکاران [28]، درویش نیا [15]، فتحی نیا و همکاران [16]، [17]، درویش نیا و همکاران [19]، بام زر و همکاران [13]، مارکواس پینتو و همکاران [29] و ساپکوتا و همکاران [6] اشاره نمود. در پژوهش حاضر عادات غذایی گونه وزغ متغیر، *Bufotes sitibundus* ساکن محیط غار و نمونه‌های بیرون از محیط غار مورد مطالعه قرار گرفت و مشخص گردید که رژیم غذایی جمعیت‌های مدنظر تا حدی شبیه همدیگر می‌باشد و وزغ مورد مطالعه در محیط بیرون غار دسترسی بیشتری برای Formicidae متعلق به Hymenoptera و قاب‌بالان دارد؛ اما دسترسی غذایی نمونه‌های وزغ ساکن غار به ترتیب به قاب‌بالان و Hymenoptera می‌باشد. چون وزغ‌ها از غارزیان اتفاقی هستند [3] و غارها را به عنوان پناهگاهی برای دوری از گرمای شدید بیرون و نیز برای تغذیه به کار می‌برند [7]، در نتیجه می‌توان از دلایل تشابه گزینه‌های غذایی نمونه‌های ساکن غار و بیرون از غار به تردد نمونه‌های وزغ بین بیرون و درون غار اشاره نمود. ساپکوتا و همکاران [6] در سال ۲۰۲۲ در مطالعه مقایسه‌ای الگوی غذایی پنج دوزیست بی‌دم دریافتند که گزینه‌های غذایی مربوط به ۱۳ راسته، عمدتاً متعلق به Hymenoptera و Lepidoptera بودند و اذعان داشتند که تفاوت‌های بین الگوی غذایی نمونه‌های بررسی شده مربوط به تنوع اندازه بدن و استراتژی‌های تغذیه‌ای دوزیست هم‌چون نشستن و منتظر ماندن یا جستجوی فعال دوزیستان می‌باشد که ممکن است تسهیل‌کننده همزیستی آن‌ها در یک مکان باشد.

بخش عمده‌ای از گزینه‌های غذایی وزغ‌های مورد مطالعه مورچه‌ها می‌باشند. تغذیه از مورچه‌ها دارای اهمیت اکولوژیکی و مفهوم تکاملی در دوزیستان دارد زیرا از مورچه‌ها به عنوان پیش سازهای قلبایی استفاده می‌کنند [30]. اندازه کوچک، تعداد فراوان و کندی حرکت سبب صید راحت‌تر مورچه‌ها توسط دوزیستان گردیده و در بیشتر مطالعات به عنوان گزینه غذایی غالب گونه‌های دوزیستان بوده است [15]، [28]. در مطالعاتی که روی گزینه‌های غذایی وزغ‌ها انجام شده، نروال و همکاران [28] نشان دادند که وزغ *Duttaphrynus melanostictus* از طیف گسترده‌ای از بی‌مهرگان به عنوان گزینه غذایی استفاده می‌کند به طوری که Hymenoptera با ۸۳/۷٪ و پس از آن قاب‌بالان و شکم‌پایان با ۴/۲۶٪ و ۲/۰۷٪ دارای بیشترین مشاهده بودند. در مطالعه دیگر، در وزغ *Pelobates syriacus* Diptera با ۵۲/۷۵٪ و Hymenoptera (عمدتاً مورچه‌ها با ۲۲/۱۲٪) و در وزغ *Epidalea viridis* مورچه‌ها دارای بیشترین مشاهده بودند [31]. در مطالعه فتحی نیا و همکاران [17]، گزینه‌های غذایی *P. syriacus* مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که این گونه در بین گزینه‌های غذایی دوبالان (Diptera)، قاب‌بالان (Coleoptera) و بال‌غشایان (Hymenoptera) را ترجیح می‌دهد. هم‌چنین تفاوت معنی‌داری بین حجم کل و تعداد گزینه‌های غذایی در هر معده بین افراد نمونه‌گیری شده در فصل بهار و تابستان وجود داشت.

در محتویات معده هر دو گروه وزغ *B. sitibundus* واقع در بیرون و داخل غار، بی‌مهرگان آبی مشاهده نگردید که از دلایل آن می‌توان گفت که چون اغلب قورباغه‌ها و وزغ‌ها شکارگران عمومی هستند و از گزینه‌های غذایی در دسترس و موجود در محیط اطرافشان استفاده می‌کنند [29] و به خاطر نحوه زندگی وزغ‌ها که صرفاً محیط مرطوب را می‌پسندند و معمولاً در داخل آب زندگی نمی‌کنند و نیز فقدان بی‌مهرگان آبی در آب جاری موجود در غار گچ زاغ و حوضچه آب داخل غار مژاره، سبب کاهش احتمال وجود بی‌مهرگان آبی در داخل محتویات معده آن‌ها بود. هرچند در مطالعات مختلفی حضور بی‌مهرگان آبی در محتویات معده گونه‌های مختلف دوزیستان بی‌دم گزارش گردیده است که می‌توان به مطالعات کرنبرنجا-ایزایلوویچ و همکاران [26]، درویش [15]، فتحی نیا و همکاران [16]، کادنووویچ و همکاران [18]، درویش و همکاران [19]، بام زر و همکاران [13] و ساپکوتا و همکاران [6] اشاره نمود.

در محتویات معده هیچ کدام از وزغ‌های بررسی شده، لارو حشرات مشاهده نشد که در تایید مطالعات گذشته که توسط کرنوبرنجا-ایزایلوویچ و همکاران [26] و کادنوویچ و همکاران [18] است. از دلایل این امر می‌توان به احتمال هضم سریع لارو یا عدم امکان صید آن‌ها توسط وزغ اشاره نمود که عمدتاً در زیرزمین یا مکان‌های مخفی قرار دارند و امکان حرکت و مشاهده آن‌ها توسط وزغ وجود نداشته و به این خاطر، در بررسی محتویات معده مشاهده نگردید. علاوه بر موارد مشاهده شده در محتویات معده وزغ، یک مورد لارو دوزیست متعلق به مهره‌داران در بین گزینه‌های غذایی وزغ‌های ورودی غار گچ زاغ وجود داشت. وجود این نمونه نشان‌دهنده رفتار هم‌نوع‌خواری دوزیستان است. در مطالعات متعددی به رفتار هم‌نوع‌خواری اشاره شده است که می‌توان به مطالعه چیکک و مرمر [25]، سیکورت لوساسیا و همکاران [27] و فتحی نیا و همکاران [16] اشاره نمود. رفتار هم‌نوع‌خواری در شرایط خاصی اتفاق می‌افتد؛ مثلاً زمانی که شرایط اکولوژیکی زیستگاه تغییر می‌کند، زمانی که تعداد افراد نابالغ در جمعیت به شدت افزایش می‌یابد و زمانی که در دسترس بودن منابع غذایی در محیط زیست آن‌ها رو به کاهش می‌گذارد [32].

نتایج به دست آمده نشان داد که همپوشانی بین الگوی غذایی وزغ *B. sitibundus* ساکن غار و نمونه‌های بیرون از غار وجود دارد. هرچند که مصرف غذا و تنوع گزینه‌های غذایی در نمونه‌های بیرون غار متنوع‌تر و با فراوانی بیشتر بود. عوامل متعددی در تغذیه دوزیستان بدون دم موثر هستند که مهم‌ترین آن را می‌توان در دسترس بودن منابع غذایی عنوان کرد که در مطالعات گذشته نیز بر این نکته تاکید گردیده است [33]. ولی محیط غار به دلیل شرایط خاصی که دارد از لحاظ منابع انرژی دارای محدودیت‌هایی است و این امر تاثیر بسزایی در کاهش تنوع و فراوانی گزینه‌های غذایی جانوران مختلف، از جمله وزغ مورد مطالعه دارد، چون رژیم غذایی دوزیستان بازتابی از تنوع و فراوانی جانوران محل زندگی آن‌ها می‌باشد [29]. به دلیل اینکه دوزیستان نیازمند زیستگاهی با استتار مناسب، دمای متعادل، رطوبت مطلوب و منابع غذایی کافی هستند، معمولاً در مناطق خشک (مثل منطقه مورد مطالعه) که اختلاف دمای درون و بیرون غارهای مورد مطالعه حتی به بیش از 25°C می‌رسد، با توجه به گرمای 49°C درجه‌ای بیرون غار، این غارها محیط طبیعی مناسبی را برای جانوران حساس به خشکی مثل وزغ‌ها فراهم نموده است. محیط غار می‌تواند مکان مناسبی برای آن‌ها باشد و از این طریق ارتباط مستقیم با تغییرات آب و هوایی نداشته و تاثیرپذیری از دمای محیط و برخورد مستقیم تابش آفتاب در زیستگاه مذکور ندارد؛ اما محدودیت‌های غذایی از برجسته‌ترین معایب مرتبط با غارهاست که وزغ مورد مطالعه با روش جستجوی فعال، با استفاده از پاهای رونده خود، به تقاطعی از غار با تراکم بیشتر فضولات حیوانی (خصوصاً گوانو خفاش) رفته و شانس کسب غذا و نیز امکان حیات قاطع‌تری برای خود فراهم می‌کند.

جانوران ساکن غار یا محیط بیرون از آن دارای اثرات مهمی بر همدیگر می‌باشند. یکی از مسائلی که خصوصاً گونه‌های ساکن غار با آن درگیر هستند بحث رقابت غذایی می‌باشد. به دلیل محدودیت‌های فضایی و منابع انرژی در غار، گونه‌های جانوری هم‌بوم برای گریز از رقابت (علی‌الخصوص رقابت غذایی) حداقل در یکی از ابعاد آشیان اکولوژیک از هم تفکیک می‌شوند و معمولاً برای همزیستی در کنار یکدیگر سعی در استفاده از منابع زیستی متفاوت دارند تا همپوشانی خود در استفاده از منابع با سایر گونه‌های هم‌بوم خود را کاهش دهند [3]. ولی دوزیستان بی‌دم که شکارگران عمومی هستند و معمولاً با جستجوی فعال به دنبال یافتن غذای مورد نیاز خود هستند، از منابع غذایی با فراوانی بیشتر در محیط زیست خود استفاده می‌کنند. انواع بی‌مهرگان ساکن غار، جهت زنده ماندن به انرژی ورودی به سیستم غار وابسته می‌باشند. بسته به نوع غار، منابع انرژی متفاوت بوده و جریان آب، گوانو خفاش، فضولات پرندگان و راست‌بالان، ریشه نفوذ کرده گیاهان و درختان و نیز جانورانی که بین بیرون و داخل غار در تردد هستند و حتی لاشه این جانوران و جانوران ساکن غار منابع اصلی و مهم انرژی غار می‌باشند. یکی از مهم‌ترین منابع غذایی در محیط غارهای مورد مطالعه گوانو خفاش و سایر مهره‌داران می‌باشد [4]، [34]. در فصول و سطوح مختلف توده گوانو، شرایط دما، pH، رطوبت نسبی، غلظت CO_2 و آمونیاک متغیر است و سبب شکل‌گیری خرد زیستگاه‌هایی در داخل غار و سازش برخی جانوران بی‌مهره با آن می‌گردد [35]. وزغ مورد مطالعه نیز با کمک جستجوی فعال به منابع غذایی بیشتر دسترسی پیدا خواهد کرد.

چون وجود دوزیستان در یک منطقه دارای اهمیت اکولوژیکی است، با حذف یک گونه دوزیست در یک محدوده‌ی جغرافیایی کوچک یا وسیع در طبیعت، اختلال تقریباً غیرقابل جبرانی در نظم زنجیره اکولوژیکی و بیولوژیکی آن محدوده یا زیستگاه ایجاد می‌شود [36]. متأسفانه در سالیان اخیر عواملی هم‌چون تردد زیاد انسان‌ها به محیط غار، روشن کردن آتش، ایجاد آلودگی‌های صوتی و شیمیایی که می‌تواند سبب از بین رفتن یا کاهش جمعیت خفاش‌های ساکن یک غار گردد، می‌تواند در زنجیره تولید یکی از منابع مهم و اصلی تولیدکننده انرژی در محیط غار اختلال ایجاد نماید و بالطبع همین امر سبب کاهش میزان گوانو خفاش و کاهش تعداد بی‌مهرگان ساکن غار وابسته به این منبع غذایی شده و در نهایت کاهش جمعیت وزغ‌های ساکن آن غار می‌شود. دوزیستان به خاطر وابستگی کامل یا نسبی به آب و محیط مرطوب در دوران مختلف زندگی، حساسیت بالایی نسبت

به تغییرات محیطی دارند و وضعیت آن‌ها در یک منطقه به عنوان شاخصی دقیق برای سلامت و کیفیت محیط زیست به حساب می‌آید [36]. متأسفانه وزغ متغیر، همانند سایر دوزیستان، با تهدیداتی هم‌چون تخریب زیستگاه و تغییرات اقلیمی مواجه هستند که سبب کاهش کیفیت زیستگاهی و عرصه زیستی آن‌ها شده و این گونه و سایر دوزیستان را مورد تهدید قرار می‌دهد و احتمال بقای آن‌ها را کم می‌نماید.

۵- نتیجه‌گیری

تاکنون اطلاعات کمی در مورد وضعیت زیستی و تغذیه‌ای وزغ‌ها، خصوصاً در محیط غار وجود دارد. در مطالعه حاضر مشخص شد که وزغ *B. sitibundus* به مانند بیشتر دوزیستان بی‌دم، چون گونه فرصت طلبی است از طیف غذایی گسترده‌ای (خصوصاً بی‌مهرگان) تغذیه می‌کند. تنوع گزینه‌های غذایی این گونه تا حدی انعکاسی از تنوع بی‌مهرگان منطقه مورد مطالعه است. اختلاف دمای درون و بیرون غارهای مورد مطالعه حتی به بیش از 25°C می‌رسد. با توجه به گرمای 49°C درجه‌ای بیرون غار، این غارها محیط طبیعی مناسبی را برای جانوران حساس به خشکی مثل وزغ‌ها فراهم نموده است؛ اما با توجه به پایین بودن تنوع و فراوانی گزینه‌های غذایی وزغ‌های ساکن غار، رقابت غذایی بیشتری در بین موجودات ساکن در این محیط‌ها مشاهده می‌شود و دوزیست مورد مطالعه نیز از این امر مستثنی نمی‌باشد. با توجه به شرایط خاص محیط‌های غار و زیندگان ساکن آن، در این پژوهش بخش کوچکی از آن بررسی گردید و به نظر می‌رسد که هنوز راهی طولانی برای فهم زوایای متعدد این محیط‌های حساس و منحصر به فرد پیش رو وجود دارد.

سپاسگزاری

این تحقیق در قالب بخشی از طرح پژوهشی و با حمایت مالی دانشگاه پیام نور انجام شده است. بدین وسیله از اعضای شورای پژوهشی دانشگاه پیام نور استان ایلام و نیز از آقایان صادق هواسی و امیر درویش نیا که در مراحل مختلف تحقیق، همکاری نموده‌اند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

اعلام تعارض منافع

نگارندگان مقاله اعلام می‌دارند که در رابطه با انتشار مقاله ارایه شده هیچ‌گونه تعارض منافی وجود ندارد.

منابع

- [1] Ford, D., & Williams, P. (2013). *Karst hydrogeology and geomorphology*. Karst Hydrogeology and Geomorphology. John Wiley & Sons. 1-562. DOI:10.1002/9781118684986
- [2] Parimuchová, A., Dušátková, L. P., Kováč, L., Macháčková, T., Slabý, O., & Pekár, S. (2021). The food web in a subterranean ecosystem is driven by intraguild predation. *Scientific reports*, 11(1), 4994. DOI:10.1038/s41598-021-84521-1
- [3] Culver, D. C., & Pipan, T. (2019). *The biology of caves and other subterranean habitats*. Oxford University Press. DOI:10.1093/oso/9780198820765.001.0001
- [4] Romero, A. (2009). *Cave biology: life in darkness*. Cambridge University Press.
- [5] Baker, G. M., Taylor, S. J., Thomas, S., Lavoie, K., Olson, R., Barton, H. A., Denn, M., Thomas, S. C., Ohms, R., Helf, K. L., Despain, J., Kennedy, J., & Larson, D. (2015). *Cave ecology inventory and monitoring framework*. U.S. National Park Service. <https://experts.illinois.edu/en/publications/cave-ecology-inventory-and-monitoring-framework>
- [6] Sapkota, S., Bhattarai, B. P., Mishra, M. R., Adhikari, J. N., & Khatriwada, J. R. (2022). Diet composition and overlap of sympatric amphibians in paddy fields of Nepal. *Herpetological conservation and biology*, 17(1), 155–164.
- [7] Rosa, G. M., & Penado, A. (2013). *Rana iberica* (Boulenger, 1879) goes underground: Subterranean habitat usage and new insights on natural history. *Subterranean biology*, 11, 15–29. <https://subtblol.pensoft.net/article/1309/download/pdf/>
- [8] Ayres, C. (2009). Post-hatching behaviour of Iberian brown frog (*Rana Iberica* Boulenger, 1879) tadpoles. *Herpetology notes*, 2(1), 141–142.
- [9] Biswas, J., & Shrotriya, S. (2011). Dandak: a mammalian dominated cave ecosystem of India. *Subterranean biology*, 8, 1–8. DOI:10.3897/subtblol.8.1224
- [10] Eisenbeis, G., Rich, C., & Longcore, T. (2006). Artificial night lighting and insects: attraction of insects to streetlamps in a rural setting in Germany. *Ecological consequences of artificial night lighting*, 2, 191–198.
- [11] Dufresnes, C., Mazepa, G., Jablonski, D., Oliveira, R. C., Wenseleers, T., Shabanov, D. A., ... & Litvinchuk, S. (2019). Fifteen shades of green: the evolution of *Bufotes* toads revisited. *Molecular phylogenetics and evolution*, 141, 106615. DOI:10.1016/j.ympev.2019.106615

- [12] Maragno, F. P., & Souza, F. L. (2011). Diet of *Rhinella Scitula* (Anura, Bufonidae) in the Cerrado, Brazil: the importance of seasons and body size. *Revista mexicana de biodiversidad*, 82(3), 879–886. DOI:10.22201/ib.20078706e.2011.3.693
- [13] Bam-E-Zar, F., Fathinia, B., & Shafaei-Pour, A. (2019). Trophology of levant green frog, *Pelophylax Bedriagae* (Amphibia: Anura: Ranidae) in Choram township, Iran. *North-western journal of zoology*, 15(2), 168–174.
- [14] Kidera, N., Tandavanitj, N., Oh, D., Nakanishi, N., Satoh, A., Denda, T., ... & Ota, H. (2008). Dietary habits of the introduced cane toad *Bufo Marinus* (Amphibia: Bufonidae) on Ishigakijima, southern Ryukyus, Japan. *Pacific science*, 62(3), 423–430. DOI:10.2984/1534-6188(2008)62[423:DHOTIC]2.0.CO;2
- [15] Darvishnia, H. (2015). Biological survey of amphibians of Talesh Township and their biological role in pest control. *Experimental animal biology*, 4(2), 45-52 (**In Persian**). https://eab.journals.pnu.ac.ir/article_2122_en.html
- [16] Fathinia, B., Rastegar-Pouyani, N., Darvishnia, H., Shafaeipour, A., & Jaafari, G. (2016). On the trophic spectrum of *Pelophylax Ridibundus* (Pallas, 1771) (Amphibia: Anura: Ranidae) in western Iran. *Zoology in the middle east*, 62(3), 247–254. DOI:10.1080/09397140.2016.1226542
- [17] Fathinia, B., Ghorbani, B., Shafaei-Pour, A., Bamzar, F., and Ebrahimzadeh, S. (2019). The diet of *Pelobates Syriacus* Boettger, 1889, from the Ghorigol wetland, East Azerbaijan province, Iran. *Herpetozona*, 31(3/4), 201–209. https://hero.epa.gov/hero/index.cfm/reference/details/reference_id/8044875
- [18] Čadenović, N., Bjelić-Čabrilo, O., Stamenković, S., & Kralj, S. (2018). On the diet of recent metamorphs and adults of the Common Toad, *Bufo Bufo* (Linnaeus, 1758). *Herpetozoa*, 30((3/4)), 139–146. https://www.zobodat.at/pdf/HER_30_3_4_0139-0146.pdf
- [19] Darvishnia, H., & Fathinia, B., & Bakhshi, Y. (2018). Notes on dietary habits and biology of the vulnerable species *Bufo Eichwaldi* (Amphibia; Anura; Bufonidae) in Iran. *Experimental animal biology*, 7(2), 55-62. (**In Persian**). https://eab.journals.pnu.ac.ir/article_5180_en.html
- [20] Statistical Yearbook of Ilam Province. (2019). The plan and budget organization, management and planning organization of Ilam province, statistics and information unit. (**In Persian**). <https://amarilam.ir/>
- [21] Jedari Eyvazi, J. (2002). *Geomorphology of Iran*. Payam Noor University Publications. (**In Persian**). <https://www.gisoom.com/book/1510795/>
- [22] Solé, M., Beckmann, O., Pelz, B., Kwet, A., & Engels, W. (2005). Stomach-flushing for diet analysis in Anurans: an improved protocol evaluated in a case study in Araucaria forests, southern Brazil. *Studies on neotropical fauna and environment*, 40(1), 23–28. DOI:10.1080/01650520400025704
- [23] Triplehorn, C. A., Johnson, N. F., & Borror, D. J. (2005). *Borror and DeLong's introduction to the study of insects*. Thomson Brooks/Cole, Belmont, CA, 864. <https://library.wur.nl/WebQuery/titel/1783537>
- [24] Choate, P. M. (2003). Introduction to the identification of insects and related arthropods. *Identifying insects and related arthropods1*, 8, 1–13. <https://entnemdept.ufl.edu/choate/insectid.pdf>
- [25] Çiçek, K., & Mermer, A. (2007). Food composition of the marsh frog, *Rana Ridibunda* Pallas, 1771, in Thrace. *Turkish journal of zoology*, 31(1), 83–90. <https://journals.tubitak.gov.tr/zoology/vol31/iss1/12>
- [26] Crnobrnja-Isailović, J., Ćurčić, S., Stojadinović, D., Tomašević-Kolarov, N., Aleksić, I., & Tomanović, Ž. (2012). Diet composition and food preferences in adult common toads (*Bufo Bufo*) (Amphibia: Anura: Bufonidae). *Journal of herpetology*, 46(4), 562–567. DOI:10.1670/10-264
- [27] Cicort-Lucaciu, A. S., Pelle, C., & Borma, I. T. (2013). Note on the food composition of a *Pelophylax Ridibundus* (Amphibia) population from the Dubova locality region, south-western Romania. *Biharean biologist*, 7(1), 33–36.
- [28] Norval, G., Huang, S. C., Mao, J. J., Goldberg, S. R., & Yang, Y. J. (2014). Notes on the diets of five amphibian species from southwestern Taiwan. *Alytes*, 30(1–4), 69. https://www.researchgate.net/profile/Gerrut-Norval/publication/267776997_Notes_on_the_diets_of_five_amphibian_species_from_southwestern_Taiwan/links/5661c71308ae192bbf8b9089/Notes-on-the-diets-of-five-amphibian-species-from-southwestern-Taiwan.pdf
- [29] Marques-Pinto, T., Barreto-Lima, A. F., & Brandão, R. A. (2019). Dietary resource use by an assemblage of terrestrial frogs from the Brazilian Cerrado. *North-western journal of zoology*, 15(2), 135–146. https://biozoojournals.ro/nwjz/content/v15n2/nwjz_e181502_Marques.pdf
- [30] Daly, J. W., Martin Garraffo, H., Spande, T. F., Jaramillo, C., & Stanley Rand, A. (1994). Dietary source for skin alkaloids of poison frogs (Dendrobatidae)? *Journal of chemical ecology*, 20(4), 943–955. DOI:10.1007/BF02059589
- [31] Covaciu-Marcov, S. D., Cupşa, D., Ferenti, S., David, A., & Dimancea, N. (2010). Human influence or natural differentiation in food composition of four Amphibian species from Histria fortress, Romania? *Acta zoologica bulgarica*, 62(3), 307–313.
- [32] Whiteman, H. H., Sheen, J. P., Johnson, E. B., VanDeusen, A., Cargille, R., & Sacco, T. W. (2003). Heterospecific prey and trophic polyphenism in larval tiger salamanders. *Copeia*, 2003(1), 56–67. DOI:10.1643/0045-8511(2003)003[0056:HPATPI]2.0.CO;2
- [33] López, J. A., Scarabotti, P. A., Medrano, M. C., & Ghirardi, R. (2009). Is the red spotted green frog *Hypsiboas punctatus* (Anura: Hylidae) selecting its preys? The importance of prey availability. *Revista de biologia tropical*, 57(3), 847–857. DOI:10.15517/rbt.v57i3.5497
- [34] Isabel Camacho, A. (1992). *The natural history of biospeleology (Monografías del Museo de Ciencias Naturales)*. CSIC Press.
- [35] Bellati, J., Austin, A., & Stevens, N. (2003). Arthropod diversity of a guano and non-guano cave at the Naracoorte caves world heritage area, South Australia. *South Australian museum* 7, 257–265. <https://digital.library.adelaide.edu.au/dspace/handle/2440/255>
- [36] Hocking, D. J., & Babbitt, K. J. (2014). Amphibian contributions to ecosystem services. *Herpetological conservation and biology*, 9(1), 1-7.

Paper Type: Original Article



Comparison of Traditional Morphological Methods and Geometric Morphometric Method for species of *Acanthopagrus* Peters, 1855 (Perciformes: Sparidae) in Persian Gulf and Gulf of Oman

Bita Dehghani¹, Faeze Yazdani Moghaddam^{1,2,*}, Mastoore Doustdar³, Seyyed Ahmadreza Hashemi⁴, Ehsan Damadi¹

¹ Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran; MSc Student, bita_dh76@outlook.com.

² Department of Animal Biological Innovation, Applied Zoology Research Center, Ferdowsi University of Mashhad, Iran; yazdani@um.ac.ir; Assistant Professor, yazdani@um.ac.ir

³ National Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Tehran, Iran; PhD, mastooreh.doustadar@gmail.com.

⁴ Far Water Fisheries Research Center, National Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Chababhar, Iran; Assistant Professor: seyedahmad91@gmail.com.

Citation:

Dehghani, B., Yazdani Moghaddam, F., Doustdar, M., Hashemi, S. A., & Damadi, E. (2023). Comparison of traditional morphological methods and geometric morphometric method for species of *Acanthopagrus* peters, 1855 (perciformes: sparidae) in Persian Gulf and Gulf of Oman. *The quarterly scientific journal of applied biology*, 36 (3), 43-53.

Received: 16/04/2023

Accepted: 12/06/2023

Abstract

Introduction: The study of fish in aquatic ecosystems is important from many aspects, including ecology, behavior, protection, and management of water resources, exploitation of reserves, and their cultivation the genus *Acanthopagrus* includes species with high economic importance and many challenges in their classification. The reason for this is the morphological similarity between a large number of their species.

Methods: The purpose of this study is to investigate the morphological diversity of 5 species of *Acanthopagrus* fishes using traditional morphometry, truss system and geometric morphometry in the Gulf of Oman and the Persian Gulf. In the present study, in traditional morphometry 17 morphometric and 10 meristic characteristics were examined. In the geometric method, 17 landmarks were placed on the images, and then morphological differences between species were subjected to Principal Component Analysis (PCA) and Canonical Variate Analysis (CVA).

Results: In the traditional approach, morphometric characteristics show the separation of *A. arabicus* species from two species, *A. bifasciatus* and *A. catenula*, meristic characteristics performed much better than quantitative characteristics and separated most of the species from each other. The number of lateral line scales and the number of scales above the lateral line showed the greatest role in the separation of the members of this genus. Also, the truss approach separated *A. catenula* and *A. bifasciatus* species from other species.

Conclusion: The geometric method shows the ability of separation of two species, *A. arabicus* and *A. sheim*.

Keywords: Traditional morphometrics, Geometric morphometric, Truss system, Persian Gulf and Gulf of Oman.



Corresponding Author: yazdani@um.ac.ir



<https://doi.org/10.22051/jab.2023.43467.1562>



مقایسه روش‌های ریخت‌شناسی سنتی و ریخت‌سنجی هندسی در گونه‌های جنس *Acanthopagrus* Peters, 1855 (Perciformes: Sparidae) در خلیج فارس و خلیج عمان

بیتا دهقانی^۱، فائزه یزدانی مقدم^{۱،۲}، مسطوره دوستدار^۳، سید احمد رضا هاشمی^۴، احسان دامادی^۱

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
^۲ استادیار، گروه نوآوری زیستی جانوری، مرکز پژوهشی جانورشناسی کاربردی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
^۳ دکتر، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.
^۴ استادیار، مرکز تحقیقات شیلاتی آب‌های دور، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، چابهار، ایران.

چکیده

مقدمه: مطالعه ماهیان در بوم‌سازگان‌های آبی از بسیاری جهات از جمله بوم‌شناسی، رفتارشناسی، حفاظت و مدیریت منابع آبی و بهره‌برداری از ذخایر و پرورش آن‌ها حایز اهمیت است. جنس *Acanthopagrus* شامل گونه‌هایی با اهمیت اقتصادی بالا است و چالش‌های بسیاری در رده‌بندی آن‌ها وجود دارد که دلیل آن، شباهت ریخت‌شناسی بسیار زیاد بین تعداد زیادی از گونه‌های این جنس می‌باشد.

روش‌ها: هدف این مطالعه بررسی تنوع ریخت‌شناسی ۵ گونه از ماهیان جنس *Acanthopagrus* با استفاده از ریخت‌سنجی سنتی، سیستم شبکه‌ای تراس و ریخت‌سنجی هندسی در خلیج عمان و خلیج فارس است. در مطالعه حاضر، در ریخت‌سنجی سنتی ۱۷ صفت اندازه‌گیری و ۱۰ صفت شمارشی اندازه‌گیری شد. در روش هندسی ۱۷ نقطه لندمارک روی تصاویر قرار داده شد، سپس اختلافات ریختی بین گونه‌ها با آنالیز مولفه‌های اصلی (PCA) و آنالیز متغیر کانونی (CVA) بررسی شد.

یافته‌ها: در رویکرد سنتی، با استفاده از صفات اندازه‌گیری جدایی گونه‌ی *A. arabicus* از دو گونه‌ی *A. bifasciatus* و *A. catenula* امکان‌پذیر می‌باشد. صفات شمارشی نسبت به صفات اندازه‌گیری برای جداسازی گونه‌ها از هم مناسب‌تر بوده و اکثر گونه‌ها از یکدیگر جدا می‌شوند. دو صفت تعداد فلس‌های روی خط جانبی و بالای خط جانبی بیشترین نقش را در جداسازی اعضای این جنس دارند. هم‌چنین رویکرد شبکه‌ای تراس، گونه‌های *A. catenula* و *A. bifasciatus* را از سایر گونه‌ها جدا کرد.

نتیجه‌گیری: در روش هندسی جدایی دو گونه‌ی *A. arabicus* و *A. sheim* از یکدیگر امکان‌پذیر می‌باشد.

کلیدواژه‌ها: ریخت‌سنجی سنتی، ریخت‌سنجی هندسی، سیستم شبکه تراس، خلیج فارس و خلیج عمان.

۱- مقدمه

مطالعات آرایه‌شناسی یک بخش ضروری از بوم‌شناسی و حفاظت گونه محسوب می‌شود [1]. خانواده شانک‌ماهیان Sparidae Rafinesque, 1818 به‌ندرت در آب‌های شیرین یافت می‌شوند، عموماً کف‌زی هستند و در آب‌های کم‌عمق معتدل و گرمسیری اقیانوس اطلس، هند و اقیانوس آرام حضور دارند [2]. از این خانواده حدود ۳۹ جنس و ۱۶۵ گونه گزارش شده است [3]. از لحاظ ظاهری دارای بدنی عمیق و فشرده هستند. رنگ بدن خاکستری کم‌رنگ متمایل به سفید، باله‌های لگنی و مخرجی متمایل به سفید با هاله زردرنگ و باله دمی زرد روشن با حاشیه سیاه می‌باشد. سرپوش

آبششی دارای یک خار کوتاه بوده و بالای آن یک لکه تیره وجود دارد. اندازه‌ی طول کل بدن آن‌ها از ۲۰ سانتی‌متر تا ۱۲۰ سانتی‌متر متغیر است [2]، [4]. جنس *Acanthopagrus Peters, 1855* با ۲۰ گونه از متنوع‌ترین جنس‌های این خانواده می‌باشد که با ۴۳ تا ۵۰ فلس شانه‌ای بر روی خط جانبی، وجود کمتر از ۵ فلس بین خط جانبی و چهارمین شعاع سخت باله پشتی، باله پشتی با ۳ شعاع سخت و ۸ تا ۹ شعاع نرم، باله‌ی مخرجی با شعاع سخت دوم طویل‌تر و ضخیم‌تر از شعاع سخت سوم، با دندان‌های آسیا در فضای درونی دهان و دندان‌های نیش بلند در جلوی دهان از سایر جنس‌های این خانواده مجزا می‌شود [5]. گونه‌های این جنس به‌طور گسترده در مصب‌ها و رودخانه‌های ساحلی خلیج‌فارس و تنگه هرمز از جمله اروندرود در مرز ایران و عراق در خوزستان یافت شده است [6]. تاکنون ۷ گونه از این جنس شامل *Acanthopagrus sheim* (شانک زرد باله منقوط) [6]، *Acanthopagrus arabicus* (شانک زرد باله عربی) [6]، *Acanthopagrus bifasciatus* (Forsskal, 1775) (شانک دو نواری)، *Acanthopagrus berda* (Fabricius, 1775) (شانک سیاه)، *Acanthopagrus randalli* (شانک خاورمیانه‌ای) [4]، (Lacepède, 1801) *Acanthopagrus omanensis* و *Acanthopagrus catenula* [7] در آب‌های خلیج‌فارس و خلیج عمان گزارش شده است [3].

ریخت‌شناسی یکی از ابزارهای کارآمدی است که در مطالعه و شناسایی جمعیت‌ها و گونه‌های ماهی به‌طور گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرد [8]. شکل بدن یک موجود زنده می‌تواند نشان‌دهنده سازگاری‌های محیطی و همچنین انعکاس‌دهنده تغییرات ژنتیکی جاندار باشد [9]. هم‌چنین، ریخت بدن به‌طور مستقیم بر ویژگی‌های مهمی مانند کارایی تغذیه، تولیدمثل و بقا تأثیر می‌گذارد [10].

تکنیک‌های مختلفی برای ریخت‌سنجی وجود دارد که به‌طور کلی می‌توان آن‌ها را به دو دسته سنتی و هندسی تقسیم نمود. در ریخت‌سنجی سنتی از تجزیه و تحلیل‌های چندمتغیره آماری برای متغیرهای کمی مانند طول، عرض و ارتفاع استفاده می‌شود [11]. از دیگر روش‌های ریخت‌سنجی، ریخت‌سنجی بر اساس شبکه تراس است که کاربردهای زیادی از جمله ریخت‌شناسی، رشدشناسی، شناسایی ذخایر و تفکیک گونه‌ها دارد [12]. این سیستم بر پایه لندمارک است که نقاط موقعیت (مختصات ۲ یا ۳ بعدی) روی نمونه هستند [9] و متغیرها فاصله‌های خطی بین دو لندمارک روی بدن می‌باشند که تراس نامیده می‌شوند [13].

ریخت‌سنجی هندسی رویکردی جدید و دقیق می‌باشد که برای تجزیه و تحلیل آماری شکل بدن ارایه شده است. این رویکرد شامل یک سری روش‌های ریخت‌سنجی می‌باشد که کلیه داده‌ها نظم و ترتیب فضایی را در طی یک آنالیز حفظ می‌کنند. این روش اجازه مجسم کردن گروه‌ها و اختلافات فردی، تنوع نمونه‌ها و سایر نتایج در فضای اولیه نمونه‌ها را امکان‌پذیر می‌سازد [14].

به دلیل تنوع بالا در خانواده شانک ماهیان و جنس *Acanthopagrus* و هم‌چنین وجود شباهت‌های زیاد بین گونه‌های این خانواده، مطالعه ریخت‌شناسی با استفاده از روش سنتی، سیستم شبکه‌ای تراس و هندسی برای شناسایی ۵ گونه از ماهیان جنس *Acanthopagrus* در خلیج‌فارس و خلیج عمان انجام شد.

۲- مواد و روش‌ها

در کل در این مطالعه تعداد ۵۵ نمونه متعلق به پنج گونه از نه ایستگاه مختلف در خلیج عمان و خلیج‌فارس جمع‌آوری شد (شکل ۱). نمونه‌ها در جعبه‌های حاوی یخ به صورت منجمد شده برای انجام مطالعات دقیق‌تر به آزمایشگاه منتقل و سپس بر اساس کلیدشناسی موجود شناسایی شدند [15]. برای استخراج داده‌های شکل بدن در مطالعات ریخت‌شناسی، از نیم‌رخ چپ نمونه‌ها تصاویر دیجیتال دوبعدی تهیه شد. جهت عکس‌برداری از نمونه‌ها در آزمایشگاه نکاتی مانند نور، فاصله دوربین تا نمونه، نوع دوربین، بزرگ‌نمایی و قرار دادن یک مقیاس طول مانند یک خط‌کش در کنار نمونه مورد توجه قرار گرفت.

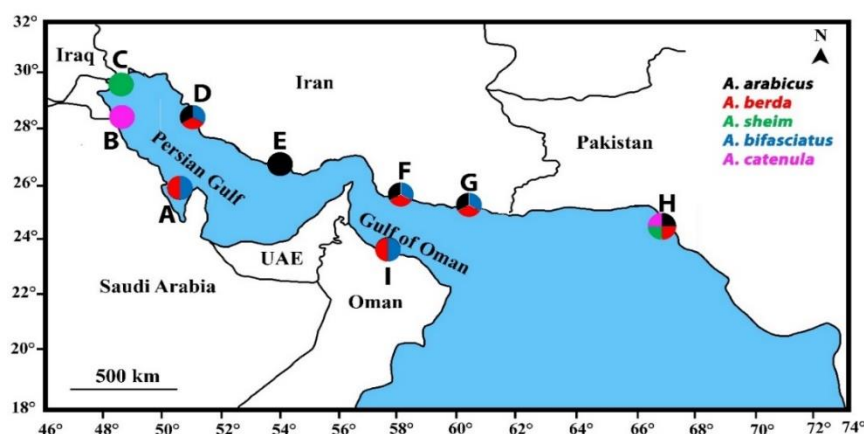
۲-۱- ریخت‌سنجی سنتی

برای مطالعه صفات ریخت‌سنجی در نمونه‌های جمع‌آوری شده از جنس *Acanthopagrus* ۱۷ صفت اندازه‌گیری با استفاده از نرم‌افزار Version Image J 1.57 اندازه‌گیری شد و ۱۰ صفت شمارشی برای انجام تحلیل‌های آماری استفاده شد (جدول ۱). داده‌های اندازه‌گیری و شمارشی ریختی با استفاده از نرم‌افزار PAST Version 4.03 آنالیز شدند [16]. در ابتدا دوریختی جنسی و تأثیر آن بر صفات مورد مطالعه توسط آنالیز MANOVA بررسی شد. برای حذف اثر اندازه در ریخت‌سنجی سنتی، از نسبت صفات به طول استاندارد استفاده شد. نرمال بودن داده‌ها با تست Shapiro-

Wilk مورد ارزیابی قرار گرفت. آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و آماره‌های توصیفی شامل میانگین و انحراف معیار برای مشخص کردن تفاوت‌های معنادار متغیرها بین گروه‌ها انجام شد. در تمام آزمون‌ها سطح معناداری $p < 0.05$ در نظر گرفته شد. تحلیل‌های چندمتغیره شامل آنالیز مولفه‌های اصلی (PCA) و تحلیل متغیر کانونی (CVA) برای تایید جدایی جمعیت‌ها و گونه‌ها انجام شد [11]. برای انجام آنالیزهای ذکر شده از نرم‌افزارهای PAST Version 4.03 و SPSS استفاده شد [16]، [17].

۲-۲- سیستم شبکه‌ای ترانس

در مطالعه ریخت‌شناسی به روش سیستم شبکه‌ای ترانس، ابتدا با استفاده از نرم‌افزار tpsUtil Version 1.76 [18] از تصاویر دیجیتالی، فایل tps تهیه و سپس روی تصاویر نمونه‌ها با نرم‌افزار tpsDig2 Version 2.31 [19]، ۱۷ نقطه لندمارک گذاشته شد (شکل ۲ [20]). ۱۵۳ فاصله ترانس بین ۱۷ نقطه لندمارک بر اساس فاصله اقلیدسی در نرم‌افزار PAST Version 1.98 اندازه‌گیری شد [16].



شکل ۱- پراکندگی جغرافیایی گونه‌های مورد مطالعه جنس *Acanthopagrus*: A- المالکيه بحرين، B- دوحه کویت، C- جزيره بوبيان عراق، D- بوشهر، E- بندرلنگه، F- جاسک، G- چابهار، H- کراچی پاکستان و I- بندر جيسه عمان.

Figure 1- Geographical distribution of the studied species of *Acanthopagrus* genus: A- Bahrain, B- Doha Kuwait, C- Bobian Island Iraq, D- Bushehr, E- Bandar Lengeh, F- Jask, G- Chabahar, H- Karachi Pakistan, I- Bandar Jissah Oman.

با توجه به این‌که صفات اندازه‌شی ماهی برخلاف صفات شمارشی در دوران زندگی ثابت نمی‌باشد و وابسته به اندازه بدن است [12]؛ بنابراین، در مطالعات ریخت‌سنجی ماهیان اثر اختلاف اندازه حذف می‌شود، زیرا اختلاف بین گروه‌ها نباید به دلیل اختلاف در اندازه نسبی آن‌ها باشد بلکه اختلاف در شکل بدن اهمیت دارد [13]. برای حذف اثر اندازه، آنالیز پروکراست^۱ انجام شد. برای تعیین اختلاف بین گونه‌های مورد مطالعه در هر یک از صفات از آنالیز واریانس یک‌طرفه^۲ استفاده شد. تحلیل مولفه‌های اصلی (PCA) و هم‌چنین تحلیل متغیر کانونی (CVA) برای فاصله‌ها به منظور بررسی تمایز گونه‌ها با نرم‌افزار PAST Version 4.03 انجام شد [21].

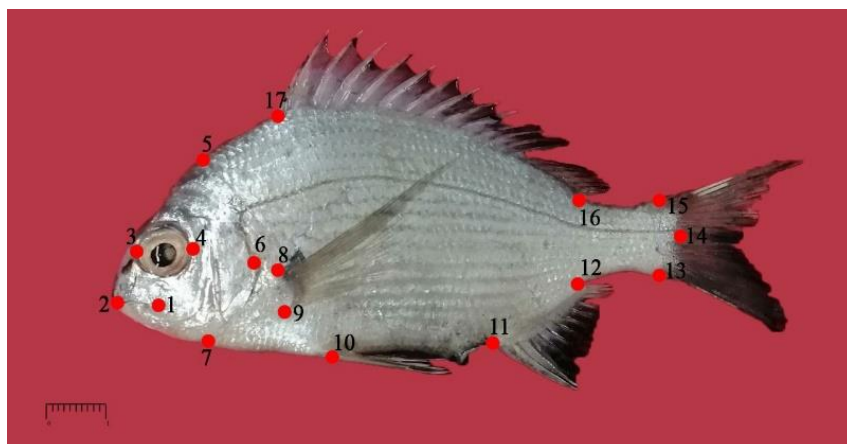
۲-۳- ریخت‌سنجی هندسی

در این مطالعه از رویکرد هندسی، برای آنالیزهای تکمیلی استفاده شد. برای استخراج داده‌های شکل بدن در روش ریخت‌سنجی هندسی، ۱۷ نقطه لندمارک بر روی تصاویر دوبعدی تعریف و با استفاده از نرم‌افزار tpsUtil Version 1.76 [18] از تصاویر دیجیتالی [18]، فایل tps تهیه و لندمارک‌ها نیز با استفاده از نرم‌افزار tpsDig2 Version 2.31 [19] رقمی شدند (شکل ۲ [19]). داده‌های حاصل پس از آنالیز پروکراست به منظور حذف اثر اندازه،

¹ Generalized Procrustes Analysis (GPA)

² One-Way-ANOVA

با استفاده از آنالیزهای تحلیل مولفه‌های اصلی (PCA) و متغیر کانونی (CVA) مورد تحلیل قرار گرفتند. همه تحلیل‌های آماری و نمودارهای مربوط به ریخت‌سنجی هندسی توسط نرم‌افزار MorphoJ Version 1.07 انجام شد [22].



شکل ۲- مکان‌های نشانه‌گذاری مورد استفاده در مطالعه شبکه‌ای ترانس روی گونه *A. berda*: ۱- گوشه دهان، ۲- نوک دهان، ۳- لبه جلویی چشم، ۴- لبه عقبی چشم، ۵- محل اتصال سر به تنه، ۶- انتهایی‌ترین بخش سرپوشش آبششی، ۷- بخش پایینی شکاف آبششی، ۸- ابتدای قاعده باله سینه‌ای، ۹- انتهای قاعده باله سینه‌ای، ۱۰- ابتدای قاعده باله شکمی، ۱۱- ابتدای قاعده باله مخرجی، ۱۲- انتهای قاعده باله مخرجی، ۱۳- لبه پایینی محل اتصال باله دم، ۱۴- انتهای خط جانبی در قاعده باله دم، ۱۵- لبه بالایی محل اتصال باله دم، ۱۶- انتهای قاعده باله پشتی، ۱۷- ابتدای باله پشتی.

Figure 2- Landmark points on *A. berda* for truss network study; 1- Corner of the mouth, 2- Tip of the mouth, 3- Front edge of the eye, 4- Rear edge of the eye, 5- Head to trunk junction, 6- The most extreme part of the operculum, 7- The lower part of the operculum, 8- The beginning of the base of the pectoral fin, 9- The end of the base of the pectoral fin, 10- The beginning of the base of the abdominal fin, 11- The beginning of the base of the caudal fin, 12- The end of the base of the caudal fin, 13- The lower edge of the junction of the caudal fin, 14- The end of the lateral line at the base of the caudal fin, 15- The upper edge of the junction of the caudal fin, 16 - The end of the base of the dorsal fin, 17- The beginning of the dorsal fin.

۳- نتایج

۳-۱- نتایج ریخت‌سنجی سنتی

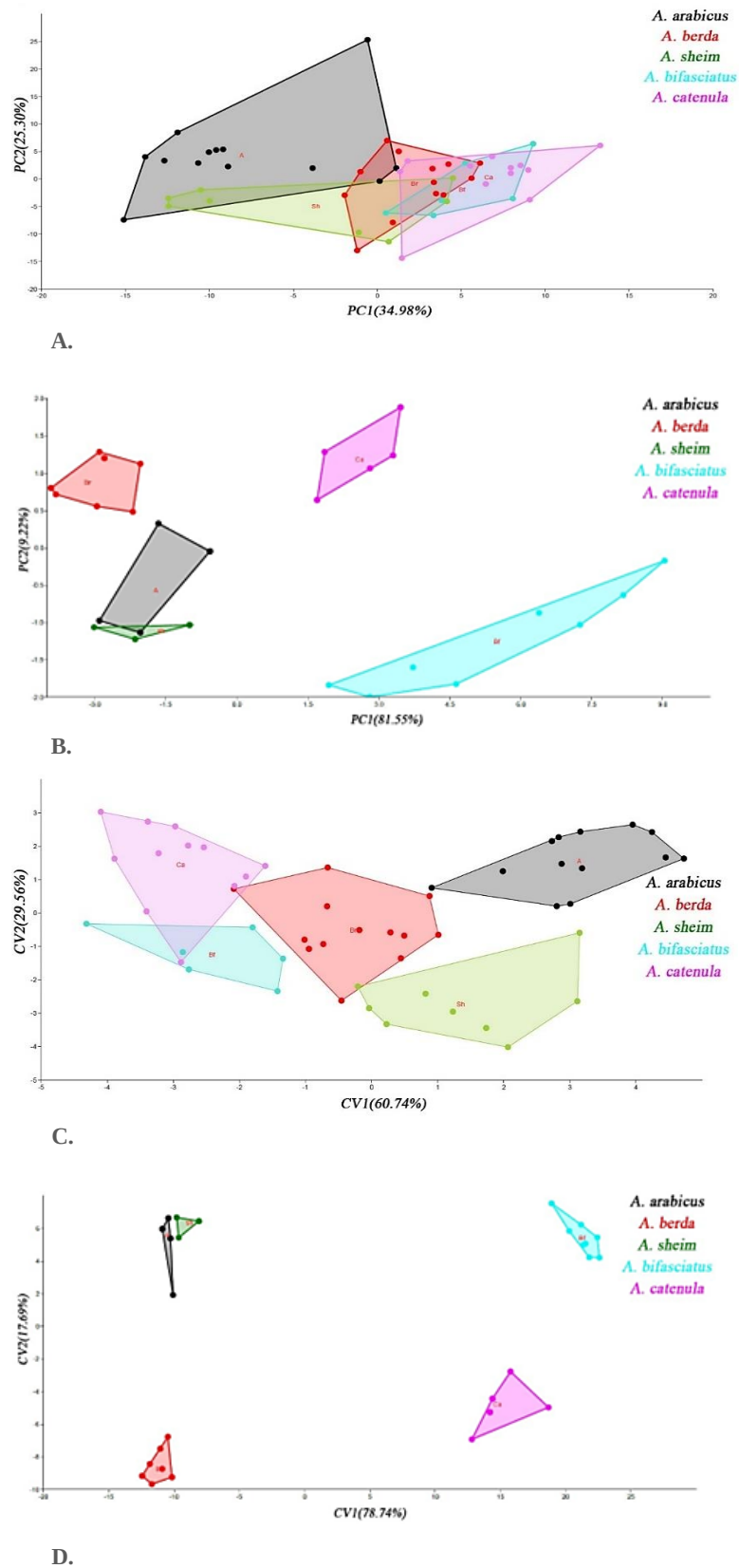
آماره‌های توصیفی شامل میانگین، انحراف معیار، واریانس و p-value برای ۱۷ صفت اندازه‌شی و ۱۰ صفت شمارشی روی ۵۵ نمونه محاسبه شده و در جدول ۱ ارائه شده است. با انجام آنالیزهای تک متغیره تفاوت معنادار بین دو جنس نر و ماده مشاهده نشد؛ بنابراین، نمونه‌های نر و ماده برای آنالیزهای آماری با هم ادغام شدند.

نتایج حاصل از تحلیل مولفه‌های اصلی بر اساس صفات شمارشی و اندازه‌شی روی گونه‌های جنس *Acanthopagrus* نشان داد که ۶۰/۲۸٪ از واریانس کلی را دو مولفه اول برای داده‌های اندازه‌شی (مولفه اول ۳۴/۹۸٪ و مولفه دوم ۲۰/۳۰٪) (شکل ۳-۱) و ۹۰/۷۷٪ واریانس کلی را دو مولفه اول برای داده‌های شمارشی (مولفه اول ۸۱/۵۵٪ و مولفه دوم ۹/۲۲٪) شامل می‌شود (شکل ۳-۲). در مولفه اول اصلی و بر اساس صفات اندازه‌شی بیشترین تفاوت مربوط به عمق بدن و طول باله شکمی است. در حالی که در مولفه اول اصلی دوم بیشترین تفاوت مربوط به عمق بدن، طول باله شکمی، طول باله مخرجی و عمق سر است. مولفه اول اصلی در صفات اندازه‌شی جدایی گونه *A. arabicus* را از دو گونه *A. catenula* و *bifasciatus* نشان می‌دهد، در حالی که در مولفه اول اصلی دوم همپوشانی بین گونه‌ها وجود دارد (شکل ۳-۱). مولفه اول و دوم بر اساس صفات شمارشی بیشترین تفاوت را در تعداد فلس‌های روی خط جانبی و بالای خط جانبی و تعداد فلس‌های روی چانه نشان می‌دهد (شکل ۳-۲). مولفه اول تا حدودی جدایی تمام گونه‌ها را به جز *A. arabicus* و *A. sheim* را نشان می‌دهد و در مولفه دوم گونه‌های *A. catenula* و *berda* تا حدی از سایر گونه‌ها جدا می‌شوند (شکل ۳-۲). متغیر کانونی بر اساس صفات شمارشی و اندازه‌شی جدایی هر پنج

گونه را نشان داد و با وجود نزدیکی بین دو گونه *A. arabicus* و *A. sheim*، این دو گونه تا حدی از یکدیگر جدا شدند (شکل‌های ۳-۲ و ۳-۳). (C)

جدول ۱- آماره‌های توصیفی صفات اندازه‌شی و شمارشی برای پنج گونه از جنس *Acanthopagrus*.

Trait	Meristic					A. <i>arabicus</i>					A. <i>berda</i>					A. <i>sheim</i>					A. <i>catenula</i>					A. <i>bifasciatus</i>					p
	<i>arabicus</i> N=13	A. Mean±S.D		<i>berda</i> N=12	A. Mean±S.D		<i>sheim</i> N=9	A. Mean±S.D		<i>catenula</i> N=11	A. Mean±S.D		<i>bifasciatus</i> N=9	A. Mean±S.D																	
dorsal fin rays	10-11	10.46±0.51		11	11±0.00		10-11	10.55±0.52		12	12±0.00		12	12±0.00	0.0005																
anal fin rays	8	8±0.00		9	9±0.00		8	8±0.00		10	10±0.53		10-11	10±0.00	0.0005																
pectoral fin rays	15	15±0.00		15	15±0.00		15	15±0.00		15	15±0.00		14-15	14±0.53	0.0005																
pelvic fin rays	5	5±0.00		5	5±0.00		5	5±0.00		5	5±0.00		5	5±0.00	1																
lateral line scales	42-45	44.07±0.86		42-44	42.7±0.72		43-47	44.4±0.72		47-48	48.50±2.44		47-54	47.50±0.52	0.0005																
scales above lateral line	4.5-5.5	4.88±0.50		3.5	3.5±0.00		4.5-5.5	4.5±0.00		4.5-5.5	4.5±0.53		5.5-6.5	4.9±0.51	0.0005																
scales below lateral line	11.5-12.5	11.96±0.51		12.5	12.50±0.00		11.5-12.5	11.94±0.52		12.5-13.5	11.6±21.4		10-14	12.91±0.51	0.0005																
scales from fifth dorsal spine base to lateral	4.5	4.5±0.00		3.5-4	3.73±0.25		4.5	4.5±0.00		4.5-5.5	6±53		5.5-6.5	4.9±0.51	0.0005																
scales from nine dorsal spine base to lateral	4.5	4.5±0.00		3.5	3.5±0.00		4.5	4.5±0.00		5-5.5	5.2±0.26		5.5	5.5±0.00	0.0005																
scale row on cheek	5-6	5.46±0.51		5-6	5.38±0.50		5-6	4.55±0.52		6-8	5.5±0.53		5-6	6.83±0.83	0.0005																
Morphometric (%SL)																															
Fork Length (FL)	107-112	109.5±1.8		108-112	110±2.44		110-114	112±1.32		111-115	113±2.02		107-111	109±1.49	0.282																
Post-orbital (POST-OL) Length	83.6-86.8	85.2±1.60		84.6-89.1	86.8±1.79		84.9-90.01	87.4±1.81		80-88.3	84.1±0.88		83.7-86.8	85.2±2.77	0.066																
Dorsal Fin Base (DFB)	47.7-59.6	53.6±2.90		53-60.5	56.7±2.49		53.3-57.7	55.5±1.07		52.3-57.3	54.7±1.50		53.1-58.3	55.7±2.08	0.267																
Ventral Fin Length (VFL)	12-27	19.5±4.97		8.7-14.4	11.5±2.20		7-21.7	14.3±7.04		5.4-17.5	11.4±1.61		6.2-10.6	8.4±3.61	0.0005																
Anal Fin Base (AFB)	13.8-20.8	17.3±1.68		13.6-19.2	16.4±1.92		14.1-17.5	15.8±1.21		15.5-20.2	17.8±1.25		16.6-19.6	18.1±1.34	0.009																
Anal Fin Length (AFL)	16.1-22.1	19.1±2.85		11.7-20.8	16.2±2.81		10.5-16.8	13.6±2.67		10.3-18.9	14.6±1.83		12.5-16.6	14.5±3.14	0.0005																
Pectoral Fin Length (PFL)	32.5-40.5	36.5±2.91		31.2-42.3	36.7±3.36		23.5-36.3	29.9±4.35		33.2-40.8	37±2.28		30.7-37.3	34±2.29	0.0005																
Pectoral Fin Base (PFB)	7.1-8.7	7.9±1.31		6.3-9.2	7.7±0.87		5.5-8.8	7.1±1.02		7-8.2	7.6±0.62		7-8	7.5±0.34	0.754																
Body Depth (BD)	35-46.7	40.8±5.39		38.7-50.7	44.7±2.86		39.6-47.9	43.7±2.96		38.2-50.4	44.3±2.37		42.9-48.6	45.7±4.05	0.079																
Dorsal Fin Length (DFL)	10.1-17.6	13.8±2.85		10.3-18.3	14.3±2.36		10.2-16.2	13.2±1.94		8-17	12.5±2.34		9.1-14	11.5±3.19	0.020																
Head Length (HL)	25.2-31.8	28.5±1.95		24.7-32.5	28.6±2.83		26.1-31.9	29±2.22		25.8-30.8	28.3±1.96		25.2-31.3	28.2±1.86	0.288																
Head Depth (HD)	30.2-37.5	33.8±4.06		29.9-37.4	33.6±2.93		28.8-35	31.9±1.85		27.9-42.6	35.2±2.52		33.7-39.6	36.6±3.76	0.011																
Eye Diameter (ED)	5.1-8.1	6.6±0.98		5.9-8.2	7.05±1.42		5-7.2	6.1±0.90		5.6-9	7.3±0.75		5.9-6.4	6.1±1.81	0.078																
Pre-orbital Length (Pre-OL)	5.3-11.3	8.3±2.32		8.3-12	10.1±1.94		6.5-12	9.2±3.00		9.6-12.5	11.05±1.40		9-12.4	10.7±1.65	0.001																
Pre-dorsal Length (PDL)	40.3-42.6	41.4±3.32		41.6-48	44.3±2.31		39.8-43.8	41.8±1.79		42.9-47.7	45.3±10.44		40.2-44.7	42.4±1.87	0.187																



شکل ۳- نمودار تحلیل مولفه‌های اصلی (A: صفات اندازه‌شی و B: صفات شمارشی) و متغیر کانونی (C: صفات اندازه‌شی و D: صفات شمارشی).

Figure 3- Principal components analysis (A. metric and B. meristic traits) and canonical variate analysis (C. metric and D. meristic traits) graphs.

۳-۲- سیستم شبکه تراس

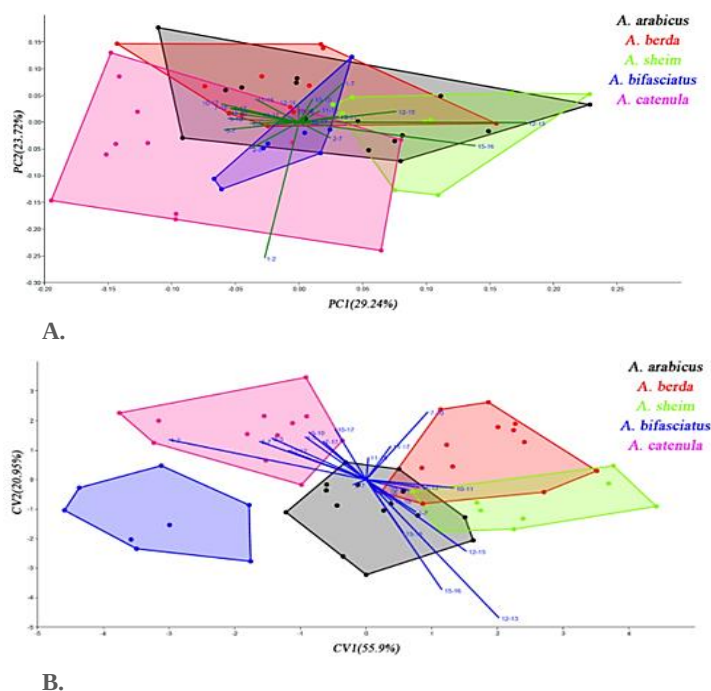
از بین ۱۵۳ فاکتور ایجاد شده ۲۲ فاکتور اول انتخاب شدند که در مجموع ۴۵/۳۱٪ از تنوع صفات ریختی بین گونه‌ها را نشان می‌دهند. در زیر به‌طور خلاصه ۲۲ صفت ذکر شده است:

۱-۲، ۱-۵، ۱-۷، ۲-۵، ۲-۷، ۵-۷، ۵-۱۰، ۷-۱۰، ۷-۱۷، ۱۰-۱۱، ۱۰-۱۶، ۱۰-۱۷، ۱۱-۱۲، ۱۱-۱۵، ۱۱-۱۶، ۱۱-۱۷، ۱۲-۱۳، ۱۲-۱۵، ۱۲-۱۶، ۱۳-۱۵، ۱۵-۱۶، ۱۶-۱۷.

در تحلیل مولفه‌های اصلی بیشترین مقادیر ویژه و درصد واریانس مربوط به دو مولفه اصلی اول است. همچنین بیشترین تغییرات در فاکتور اول مربوط به صفات ۱۲-۱۳، ۱۵-۱۶ و ۱۵-۱۲ می‌باشد و در فاکتور دوم صفات ۱-۲ و ۷-۱ بیشترین تغییرات را شامل می‌شوند (شکل ۴-۱). مولفه‌ی اول ۲۹/۲۴٪ از کل تغییرات صفات بین گونه‌ها را نشان می‌دهد. مولفه‌ی دوم ۲۳/۷۲٪ از تغییرات بین گونه‌ها را شامل می‌شود. در مولفه اصلی اول و دوم همپوشانی بین گونه‌ها وجود دارد. در محور کانونی اول گونه‌های *A. catenula* و *A. bifasciatus* از دو گونه *A. sheim* و *A. arabicus* جدا شده است، اما محور کانونی دوم قادر به جدا کردن گونه‌ها نیست (شکل ۴-۲).

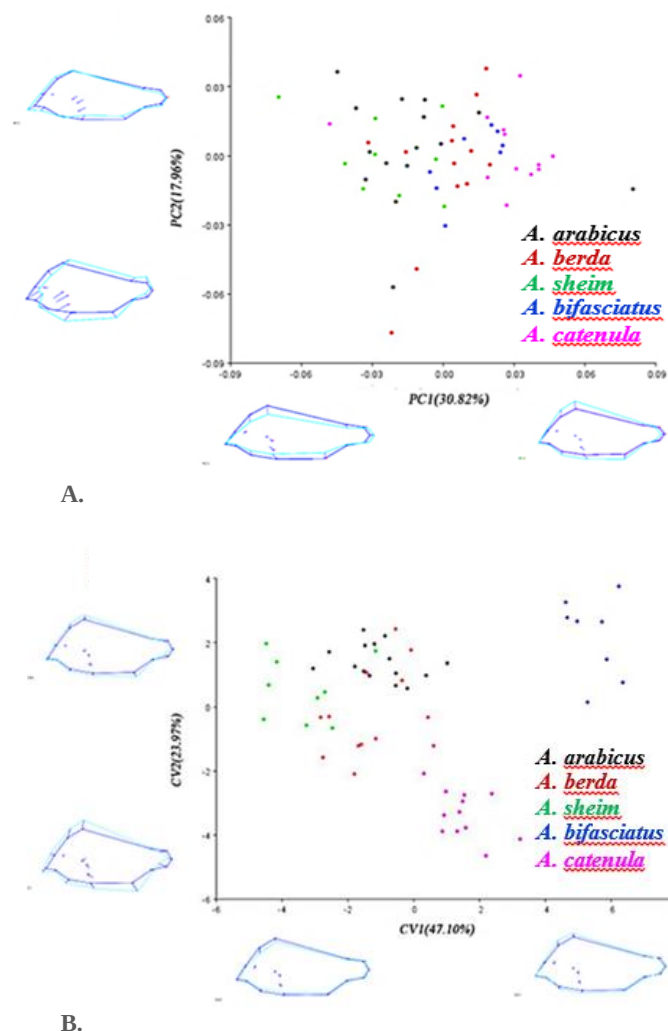
۳-۳- ریخت‌سنجی هندسی

در تحلیل مولفه‌های اصلی، ۷۸٪/۴۸ از واریانس کلی توسط دو مولفه اصلی اول (مولفه‌ی اول ۳۰/۸۲٪ و مولفه‌ی دوم ۱۷/۹۶٪) نشان داده شد (شکل ۴-۵). بقیه‌ی محورها، واریانس زیر ۱۰٪ را نشان دادند. مولفه‌ی اول بیشترین تغییرات را در عمق بدن و باله پشتی نشان داد، درحالی‌که بیشترین تغییرات در مولفه‌ی اصلی دوم مربوط به طول سر، انتها و ابتدای قاعده باله سینه‌ای و ابتدای قاعده باله شکمی است (شکل ۴-۶). در مولفه اصلی اول *A. catenula* از *A. arabicus* و *A. sheim* تا حدی جدا می‌شود، درحالی‌که در مولفه دوم همپوشانی کامل بین گونه‌ها وجود دارد (شکل ۴-۵). در نمودار متغیر کانونی در طول محور کانونی اول گونه *A. bifasciatus* از سایر گونه‌ها جدا می‌شود. همچنین دو گونه‌ی *A. arabicus* و *A. sheim* در طول محور کانونی اول از یکدیگر جدا می‌شوند. در محور کانونی دوم گونه‌ی *A. catenula* از سایر گونه‌ها جدا می‌شود (شکل ۴-۵).



شکل ۴- نمودار تحلیل مولفه‌های اصلی (A) و متغیر کانونی (B) بر اساس سیستم شبکه‌ای تراس.

Figure 4- Principal component analysis diagram (A) and focal correlation (B) based on the terrace grid system.

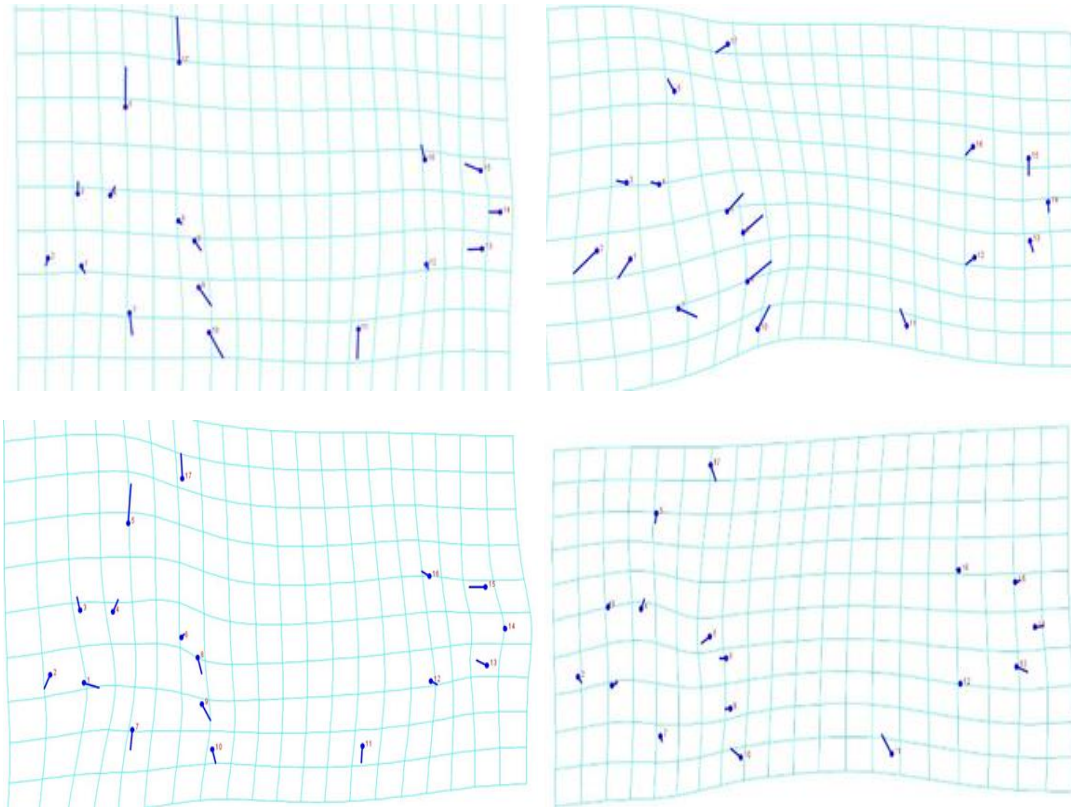


شکل ۵- نمودار تحلیل مولفه‌ی اصلی (A) و متغیر کانونی (B) بر اساس ریخت‌سنجی هندسی.
Figure 5- Principal component analysis diagram (A) and focal correlation (B) based on geometric morphometry

۴- بحث

مطالعه ویژگی‌های جانوران از نظر اندازه و شمارش از گذشته تا امروز دارای اهمیت بسیاری بوده و در گذشته تصور می‌شد تغییرات ریختی فقط ژنتیکی است، اما امروزه مشخص شده است که در تغییرات ریختی هم محیط و هم ژنتیک تاثیرگذار هستند و گاهی ممکن است این اختلافات ریختی ناشی از تاثیرات محیطی باشد و ژنتیک نقشی در آن نداشته باشد [2]. مطالعه حاضر تغییرات ریختی پنج گونه از جنس *Acanthopagrus* از خلیج فارس و خلیج عمان را بر اساس رویکرد سنتی، تراس و هندسی بررسی کرده است. این مطالعه در مقایسه با مطالعات قبلی، تعداد گونه‌های بیشتر با منطقه جغرافیایی وسیع‌تری را پوشش می‌دهد [2، 23].

تغییرات و تفاوت‌های ریختی در بین گونه‌های ماهیان به واسطه تفاوت‌های رفتاری مثل تغذیه و شنا برای سازش آن‌ها با شرایط زیستگاه می‌باشد [24]. درواقع صفات ریختی می‌توانند انعطاف‌پذیری بالایی در پاسخ به فاکتورهایی نظیر تغییرات دما، شوری، سرعت آب، دسترسی به مواد غذایی، جریان آب، الگوی شنا، نور و ... داشته باشند [25]. نتایج تحلیل‌های تک‌متغیره و چندمتغیره در روش ریخت‌سنجی سنتی، نشان داد که صفات شمارشی نسبت به صفات اندازه‌شنی بهتر می‌توانند جدایی گونه‌ها را از یکدیگر نشان دهد. نتایج آنالیز تحلیل مولفه‌ی اصلی (PCA) نشان داد که عمق بدن، طول باله‌ی شکمی، طول باله‌ی مخرجی و طول سر در خصوصیات اندازه‌شنی (شکل ۳-۱) و تعداد فلس‌های روی خط جانبی، بالای خط جانبی و روی چانه در خصوصیات شمارشی (شکل ۳-۲)، دارای بیشترین تغییر در گونه‌های مطالعه شده می‌باشند. در تحلیل نمودار متغیر کانونی (CVA) صفات شمارشی (شکل ۳-۲)، گونه‌های مورد مطالعه به وضوح در گروه‌های جدا از هم قرار گرفتند.



شکل ۶- تغییرات شکل بدنی گونه‌های مورد مطالعه‌ی جنس *Acanthopagrus* شامل مولفه اصلی (PC1-PC2) و متغیر کانونی (CV1-CV2).

Figure 6- Body shape changes of the studied species of the genus *Acanthopagrus* including the principal component (PC1-PC2) and focal correlation (CV1-CV2).

گونه‌ی *A. arabicus* مدت‌ها به‌عنوان گونه‌ی *A. latus* (Houttuyn, 1782) در نظر گرفته می‌شد. در سال ۲۰۱۳ وضعیت آرایه شناختی این گونه توسط ایواتسوکا [5] مورد بررسی قرار گرفت و این گونه‌ی کمپلکس با توجه به ویژگی‌های ریختی و مولکولی به ۵ گونه تقسیم شد که دو گونه‌ی *A. arabicus* در سواحل غرب اقیانوس هند، خلیج فارس و دریای عمان و گونه‌ی *A. sheim* در خلیج فارس گزارش شد. باوجود شباهت‌های ریختی بسیار بین این دو گونه، در این مطالعه بر اساس تفاوت در تعداد فلس‌های روی خط جانبی این دو گونه از یکدیگر جدا شدند.

نتایج آنالیز صفات شمارشی و اندازه‌ی گونه‌های جنس *Acanthopagrus* نشان داد که برای جداسازی گونه‌ها از یکدیگر صفات شمارشی به‌مراتب بهتر از صفات اندازه‌ی می‌باشد. در روش تراس که یک روش مبتنی بر فاصله می‌باشد، نتایج به‌دست آمده از تحلیل واریانس یک‌طرفه نشان داد که ۲۲ ویژگی ریختی در بین گونه‌های مورد مطالعه دارای تفاوت معنی‌دار هستند که نشان‌دهنده تفاوت در شکل بدن گونه‌های مورد مطالعه می‌باشد. در بیشتر مطالعات ریخت‌سنجی فاکتور اندازه بدن ممکن است به میزان ۸۰٪ یا بیشتر در وجود تغییرات بین متغیرهای اندازه‌گیری شده تأثیرگذار باشد [26]. از آنجاکه آزمون واریانس یک‌طرفه روی ویژگی‌های ریختی اصلاح شده انجام شد، می‌توان مطمئن بود که مشاهده اختلاف معنی‌دار آماری در هر یک از فاصله‌های اندازه‌گیری شده، نشان‌دهنده اختلاف در شکل بدن می‌باشد و تفاوت در اندازه نمونه‌ها تأثیری در به وجود آمدن این اختلاف ندارد. نتایج تحلیل مولفه‌های اصلی برای ویژگی‌های ریختی اصلاح شده در روش تراس نیز نشان داد که گونه‌های *A. catenula* و *A. bifasciatus* از سایر گونه‌ها جدا می‌شوند. در روش هندسی هم‌چنین تحلیل نمودار متغیر کانونی جدایی گونه‌های *A. catenula* و *A. bifasciatus* را به‌خوبی نشان داد. هم‌چنین با توجه به نمودار متغیر کانونی، دو گونه‌ی *A. arabicus* و *A. sheim* در طول محور اول از یکدیگر جدا می‌شوند (شکل ۵- B).

در روش ریخت‌سنجی هندسی نتایج بیانگر تفاوت شکل بدن گونه‌های مورد مطالعه بیشتر در ناحیه باله پستی، باله سینه‌ای، باله شکمی و عمق سر به‌واسطه سازگاری با شرایط زیستگاهی است. این تغییرات با سازش‌های بوم‌شناختی و انتخاب طبیعی در ارتباط است [27]، [28]. روش tps در ریخت‌سنجی هندسی بر پایه لندمارک کمی قوی‌تری از تفاوت‌های مورفولوژیکی بین اشکال به همراه داشت، اگرچه در روش‌های سنتی نیز

این گونه‌ها جدا شدند. شاید مهم‌ترین نتیجه، تفسیر منحصر به فرد تغییر شکل در میان روش‌های سنتی مبتنی بر تراس بود، در حالی که تولید شبکه‌های تغییر شکل با استفاده از رویکرد tps ارقام واضح و قابل تفسیر بصری را به همراه داشت.

۵- نتیجه‌گیری

نتایج به دست آمده در این مطالعه نشان می‌دهد که ریخت‌سنجی هندسی می‌تواند روش مؤثرتری برای تجزیه و تحلیل و تفسیر فرم بدن باشد. هم‌چنین می‌توان به روش‌های سنتی برای ارایه شواهد آماری از تفاوت‌های شکل بدن اعتماد کرد، اگرچه لزوماً اطلاعات دقیقی در مورد ماهیت تغییر شکل به ما نمی‌دهد؛ بنابراین، مطالعات مولکولی آینده می‌تواند روابط بین اعضای جنس *Acanthopagrus* را روشن‌تر کند و نشان دهد که این ویژگی‌های ریختی شناسایی شده چقدر می‌تواند با رویکرد ژنتیکی مطابقت داشته باشد.

قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی دانشگاه فردوسی مشهد انجام شده است.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

منابع

- [1] Keivany, Y., Zamani-Faradonbe, M., Mousavi, S. M. A., & Dorafshan, S. (2018). Morphological variations of *Alburnus mossulensis* (Heckel, 1843) populations in Iran. *Iranian journal of animal biosystematics*, 14(2), 73-89.
- [2] Doustdar, M., Kaymaram, F., Seifali, M., Jamili, S., & Bani, A. (2017). Identification species of *Acanthopagrus* (family: Sparidae) and stock identification of dominant species in the Persian Gulf and Oman Sea using geometric morphometry and otolith. (In Persian). <http://hdl.handle.net/1834/13317>
- [3] Eschmeyer, W. N., Fricke, R., & Der Laan, R. (2017). *Catalog of fishes: genera, species, references*. https://www.researchgate.net/profile/Richard-Van-Der-Laan/publication/303633861_Catalog_of_Fishes_Genera_Species_References/links/574ed78708ae789584d80783/Catalog-of-Fishes-Genera-Species-References.pdf
- [4] Iwatsuki, Y., & Carpenter, K. E. (2006). *Acanthopagrus taiwanensis*, a new sparid fish (Perciformes), with comparisons to *Acanthopagrus berda* (Forsskal, 1775) and other nominal species of *Acanthopagrus*. *Zootaxa*, 1202(1202), 1-19. DOI:10.11646/zootaxa.1202.1.1
- [5] Iwatsuki, Y. (2013). Review of the *Acanthopagrus latus* complex (Perciformes: Sparidae) with descriptions of three new species from the Indo-West Pacific Ocean. *Journal of fish biology*, 83(1), 64-95. DOI:10.1111/jfb.12151
- [6] Esmaeili, H. R., Masoudi, M., & Mehraban, H. R. (2014). Assignment of *Acanthopagrus* populations in the Persian Gulf drainage system of Iran to *Acanthopagrus arabicus* Iwatsuki, 2013 (perciformes: Sparidae). *Iranian journal of ichthyology*, 1(1), 23-28.
- [7] Iwatsuki, Y., & Heemstra, P. C. (2011). A review of the *Acanthopagrus bifasciatus* species complex (Pisces: Sparidae) from the Indian Ocean, with redescription of *A. bifasciatus* (Forsskal 1775) and *A. catenula* (Lacepède 1801). *Zootaxa*, 3025(3025), 38-50. DOI:10.11646/zootaxa.3025.1.2
- [8] Eagderi, S., Mouludi-Saleh, A. (2020). Morphological comparison of the *Cobitis* species from Iranian inland waters using geometric morphometric method. *Journal of applied biology in prees*, 34(1), 9-20.
- [9] Pishkhpour, Z., Poorbagher, H., & Eagderi, S. (2019). Comparing efficiency of traditional and geometric morphometrics in distinguishing populations of *Alburnus doriae* in the central and western basins of Iran. *Journal of applied ichthyological research*, 7(2), 1-12.
- [10] Guill, J. M., Hood, C. S., & Heins, D. C. (2003). Body shape variation within and among three species of darters (Perciformes: Percidae). *Ecology of freshwater fish*, 12(2), 134-140. DOI:10.1034/j.1600-0633.2003.00008.x
- [11] Adams, D. C., Rohlf, F. J., & Slice, D. E. (2004). Geometric morphometrics: Ten years of progress following the 'revolution.' *Italian journal of zoology*, 71(1), 5-16. DOI:10.1080/11250000409356545
- [12] Khatami Nejad, S. S., Mousavi Sabet, S. H., Sattari, M., & Vatan Doust, S. (2015). A comparative study on morphometric characters of five Spirin species (Cyprinidae: *Alburnus*) in Iranian inland waters using a truss network system. *Journal of animal environment*, 7(1), 247-258.
- [13] Haghighy, E., Sattari, M., Dorafshan, S., Keivany, Y., Khoshkholgh, M. R., & Mousavi, S. H. (2013). A Comparison of the morphological characteristics of Spirin, (Cyprinidae: *Alburnoides echiwaldii*) in karganrud and chalus rivers using truss network system. *Journal of applied ichthyological research*, 1(1), 41-52.

- [14] Sharifiniya, M., & Mousavi Sabet, H. (2016). Comparison of morphological variations among populations of the crested loach, genus *paracobitis*, in the southeast Caspian Sea Basin using geometric morphometric method. *Journal of oceanography*, 7(27), 49–57.
- [15] Randall, J. E. (1995). *Coastal fishes of Oman*. University of Hawaii Press.
- [16] Hammer, Q., & Harper, D. A. T. (2010). *PAST Version 1.98*. Stony Brook.
- [17] Elliott, N. G., Haskard, K., & Koslow, J. A. (1995). Morphometric analysis of orange roughy (*Hoplostethus atlanticus*) off the continental slope of southern Australia. *Journal of fish biology*, 46(2), 202–220.
- [18] Rohlf, F. (2018). *TPSUtil, ver. 1.76*. Stony Brook.
- [19] Rohlf, F. J. (2010). *TpsDig2 ver. 2.32*. Stony Brook.
- [20] Eagderi, S., & Kamal, S. (2013). Application of geometric morphometrics approach in phenotypic plasticity investigations of fishes: A case study of killifish *Aphanius sophiae* (Heckel, 1847) body shape comparison in Cheshme-Ali (Damghan) and Shour River (Eshtehard). *Journal of applied ichthyological research*, 1(2), 47–52. <http://jair.gonbad.ac.ir/article-1-215-en.html>
- [21] Hammer, Ø., Harper, D. A. T., & Ryan, P. D. (2001). Past: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia electronica*, 4(1), 1–9.
- [22] Klingenberg, C. P. (2011). Morphoj: An integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular ecology resources*, 11(2), 353–357. DOI:10.1111/j.1755-0998.2010.02924.x
- [23] Ahmed, I., Bano, A., & Siddique, S. (2021). Morphometric and meristic characters and condition factor of *Acanthopagrus arabicus* (Pisces: Sparidae) from Pakistan, North Arabian Sea. *Natural and engineering sciences*, 6(2), 75–86. DOI:10.28978/nesciences.970537
- [24] Moles, M. D., Robinson, B. W., Johnston, T. A., Cunjak, R. A., Jardine, T. D., Casselman, J. M., & Leggett, W. C. (2010). Morphological and trophic differentiation of growth morphotypes of walleye (*Sander vitreus*) from Lake Winnipeg, Canada. *Canadian journal of zoology*, 88(10), 950–960. DOI:10.1139/Z10-062
- [25] Doustdar, M., Kaymaram, F., Seifali, M., Sh, J., & Bani, A. (2019). Stock identification of Arabian yellow fin sea bream (*Acanthopagrus arabicus*) using shape of otolith in the Northern Persian Gulf and Oman Sea. *Iranian journal of fisheries science*, 18(1), 60–70. (In Persian). DOI:10.22092/IJFS.2018.116366
- [26] Tzeng, T. Der. (2004). Morphological variation between populations of spotted mackerel (*Scomber australasicus*) off Taiwan. *Fisheries research*, 68(1–3), 45–55. DOI:10.1016/j.fishres.2004.02.011
- [27] Price, S. A., Tavera, J. J., Near, T. J., & Wainwright, P. C. (2013). Elevated rates of morphological and functional diversification in reef-dwelling haemulid fishes. *Evolution*, 67(2), 417–428. DOI:10.1111/j.1558-5646.2012.01773.x
- [28] Damadi, E., Moghaddam, F. Y., Ghassemzadeh, F., & Ghanbarifardi, M. (2021). Aspects of morphometry, distribution, and key identification of the genus *Pomadasys* (Perciformes: Haemulidae) from the Persian Gulf and Gulf of Oman with descriptions of new records. *Thalassas*, 37(2), 671–682. DOI:10.1007/s41208-021-00308-1



Paper Type: Original Article



Nano-Titanium Oxide and Nano Zinc Oxide Foliar Application Ameliorates the Salinity Stress Effects on *Matricaria Chamomilla*

Iraj Ezzatmand¹, Lamia Vojodi Mehrabani^{1,*}, Ali Abdolzadehfard²

¹Department of Medicinal Plants, Agriculture and Plant Breeding, Shahid Madani University of Azerbaijan, Tabriz, Iran; MSc Student, izzatmand@gmail.com; Associate Professor: Corresponding author, vojodilamia@gmail.com.

²Department of Agricultural Biotechnology, Shahid Madani University of Azerbaijan, Tabriz, Iran; MSc Student, ali_abdolzadehfard@yahoo.com.

Citation:

Darvishnia, H., & Kavyanifard, A. (2023). Comparison of diet composition of variable toad *Bufo* *Sitibundus* (amphibia: Anura: Bufonidae), inside and outside the caves in west of Iran. *The quarterly scientific journal of applied biology*, 36(3), 80-94.

Received: 06/05/2023

Accepted: 17/09/2023

Abstract

Introduction: Salinity stress is one of the most important abiotic stresses in the world that influence the plant growth and productivity. The aim of this study was to investigate the effects of salinity stress (0, 75 and 150 mM) and foliar application of nano TiO₂ and ZnO (0, 2 and 4 mg L⁻¹) on the growth and some physiological and biochemical traits of *Matricaria chamomilla*.

Methods: Salinity stress was applied in 3-4 leaf stage of plant under hydroponic conditions. The foliar spraying with nanoparticle was done simultaneously with the initiation of salinity stress. 38 days after second foliar treatment, the plants were harvested to study the desired traits.

Results: The highest flower dry weight was obtained in the NaCl₀ × both concentrations of nano ZnO and TiO₂. The highest concentration of chlorophyll a (20-50 %) was obtained in NaCl₀ × both levels of ZnO and TiO₂ nanoparticles and NaCl_{75mM} × 4 mgL⁻¹ nano ZnO. Malondialdehyde and proline content in plant increased at 150 mM salinity stress.

Conclusion: The results showed that the foliar treatment of TiO₂ and ZnO nanoparticles improved elemental content, yield and total protein content of the plant under no-salinity, and 75 mM NaCl salinity conditions.

Keywords: Chlorophyll, Elemental content, Malondialdehyde, Proline.





تأثیر محلول پاشی نانوذره اکسید تیتانیوم و اکسید روی بر کاهش اثرات تنش شوری در گیاه بابونه (*Matricaria chamomilla*)

ایرج عزتمند^۱، لمیا وجودی مهربانی^{۱*}، علی عبدالزاده فرد^۲

^۱گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران.

^۲گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران.

چکیده

مقدمه: تنش شوری یکی از مهم‌ترین تنش‌های غیرزیستی است که رشد گیاه را تحت تأثیر قرار می‌دهد. هدف از این مطالعه، بررسی تأثیر تنش کلرید سدیم (۰، ۷۵ و ۱۵۰ میلی‌مولار) و محلول پاشی نانوذره‌های اکسید تیتانیوم و اکسید روی (۰، ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر) بر رشد و برخی صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی بابونه (*Matricaria chamomilla*) بود.

روش‌ها: تنش شوری در مرحله ۳-۴ برگی گیاه، در کشت هیدروپونیک اعمال شد و محلول پاشی با نانوذرات هم‌زمان با اعمال تنش شوری انجام شد. ۳۸ روز بعد از دومین محلول پاشی، گیاهان، برای مطالعه صفات مورد نظر برداشت شدند.

یافته‌ها: بیش‌ترین وزن خشک گل در تنش شوری صفر با محلول پاشی هر دو سطح نانوذره‌های اکسید روی و تیتانیوم مشاهده شد. محلول پاشی هر دو سطح نانوذره‌های اکسید روی و تیتانیوم در تنش شوری صفر و محلول پاشی ۴ میلی‌گرم در لیتر نانوذره اکسید روی در تنش شوری ۷۵ میلی‌مولار موجب افزایش محتوای کلروفیل a (۲۰ تا ۵۰ درصدی) شد. تنش شوری ۱۵۰ میلی‌مولار موجب افزایش محتوای مالون دی‌آلدنید و پرولین شد.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که محلول پاشی با نانوذره‌ها موجب بهبود محتوای عناصر، کلروفیل، عملکرد و پروتئین کل گیاه در شرایط تنش صفر و ۷۵ میلی‌مولار کلرید سدیم شد.

کلیدواژه‌ها: پرولین، کلروفیل، مالون دی‌آلدنید، محتوای عناصر.

۱- مقدمه

افزایش جمعیت و استفاده روزافزون از فرآورده‌های حاصل از گیاهان دارویی، نقش این گیاهان را در چرخه اقتصاد جهانی پررنگ نموده است. بابونه (*Matricaria chamomilla*) گیاهی یک‌ساله از خانواده آسترace است که بومی شرق اروپا، شمال و غرب آسیا می‌باشد و در بسیاری از نقاط جهان نیز رشد می‌کند [1]. این گیاه یکی از قدیمی‌ترین گیاهان دارویی شناخته شده است که دارای خواص درمانی مانند درمان عفونت‌ها، اختلالات عصبی، تنفسی، آرام‌بخش، ضداسپاسم، ضد عفونی‌کننده، ضد استفراغ، ضد قارچ، ضد انگل، ضد دیابت، ضد سرطان، رفع اختلالات گوارشی و کبدی می‌باشد [2]، [3]. اسانس بابونه حاوی بیش از ۱۲۰ ترکیب مختلف مانند ترپنئوئیدهای آلفا-بیزابول، کامازولن و بتا-فارنیزین می‌باشد. عصاره گیاه، حاوی ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها و کومارین است. تنوع ترکیبات موجود در این گیاه، موجب کاربرد گسترده آن در صنایع غذایی و دارویی شده است [2]، [3].

تغییرات اقلیمی، افزایش دمای کره زمین و تنش های محیطی، سبب کاهش عملکرد محصولات کشاورزی شده است. یکی از مهم ترین تنش های محیطی که تولید محصولات کشاورزی را در سراسر جهان تهدید می کند تنش شوری می باشد [4]. شوری با ایجاد اختلال در فرآیندهای مختلف فیزیولوژیکی، متابولیسمی (فتوسنتز، تعرق و هدایت روزنه ای)، بیوشیمیایی و مولکولی سبب کاهش عملکرد و رشد گیاهان می شود. ایجاد تنش اسمزی در اثر کاهش پتانسیل آب برگ و افزایش تولید گونه های فعال اکسیژن، نیتروژن و کربونیل، از دیگر اثرات تنش شوری بر گیاه است. مسمومیت یونی ناشی از تنش شوری با ایجاد اختلال در هموستازی یونی در سلول، عدم تعادل در جذب مواد مغذی و توزیع آن در سلول موجب از هم پاشیدگی غشای سلول می شود [7-5]. تحقیقات متعدد انجام شده در گیاهان مختلف نشان دهنده تاثیر منفی تنش شوری بر صفات رشدی و عملکردی گیاه است [4، 8]. بررسی انجام شده در بادرشبی (*Dracocephalum moldavica* L.) نشان داد که تنش شوری موجب کاهش ارتفاع و عملکرد گیاه، کاهش محتوای کلروفیل، افزایش نشت یونی و محتوای آب نسبی برگ شد [9]. نتایج مشابهی در خصوص کاهش وزن خشک گل و محتوای اسانس گیاه بابونه در اثر تنش شوری گزارش شد [10].

تکنیک های به زراعی و کاربرد نانوذرات نقش مهمی در توسعه کشاورزی داشته است. امروزه در کشاورزی مدرن از فناوری نانو به عنوان جایگزینی برای کودهای شیمیایی و سموم دفع آفات در کشاورزی استفاده می شود [11]. اندازه کوچک نانوذرات (۱ تا ۱۰۰ نانومتر) موجب ایجاد خواص فیزیک و شیمیایی متفاوتی (حلالیت، بارسطحی، تجمع پذیری و سطح ویژه بالا) برای آن ها شده است. نسبت بالای سطح به حجم نانوذرات و کمک به افزایش جذب برخی عناصر معدنی مغذی موجب بهبود رشد گیاه می شود [12]. امروزه، استفاده از پوشش های فوتوکاتالیستی نانوذره تیتانوم موجب کاربرد گسترده ای آن در صنایع مختلف (کاهش آلودگی هوا و محیط زیست) و کشاورزی (بهبود فتوسنتز، کاهش اثرات منفی تنش های زیستی و غیر زیستی) شده است. نانوذره تیتانیوم به عنوان محرک رشدی در غلظت کم موجب افزایش رشد ساقه و ریشه گیاه از طریق تحریک تقسیم سلولی و بهبود متابولیسم گیاه و کاهش محتوای پراکسید هیدروژن می شود [13]. نتایج بررسی انجام شده در جو نشان داد که استفاده از نانوذره تیتانیوم موجب کنترل تنش شوری از طریق افزایش فتوسنتز می شود [4]. نانوذره تیتانیوم با بهبود ویژگی های بیوشیمیایی و مورفو-فیزیولوژیکی، افزایش فتوسنتز، محتوای کلروفیل، فعالیت آنزیم روبیسکو، خاصیت آنتی اکسیدانی ذرت [14]، افزایش محتوای قند محلول، پرولین، کاهش محتوای پراکسید هیدروژن و مالون دی آلدنید تحت شرایط تنش شوری به مقاومت گیاه لوبیا [13] در مقابل تنش کمک می کند.

روی یکی از مهم ترین عناصر غذایی ریز مغذی مورد نیاز گیاه است که نقش مهمی در رشد و نمو گیاه، بیوسنتز پروتئین و کلروفیل، تولید مثل گیاه، مقاومت در برابر تنش های محیطی و فعالیت آنزیمی گیاه دارد [15]. نانوذره روی موجب حفظ تمامیت غشای سلول، بهبود فعالیت آنزیمی گیاه، افزایش بیان ژن، کنترل جذب سدیم و کاهش جذب سایر یون های سمی می شود [8]. برخی یافته ها نشان داد که کاربرد نانوذره اکسید روی باعث کاهش پراکسیداسیون لیپیدها، افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی (اسکوربات پراکسیداز و کاتالاز) در ذرت شد [16]. تحت شرایط تنش شوری محلول پاشی با نانوذره روی موجب افزایش محتوای پتاسیم، روی، کلروفیل، فلاونوئید، اسانس و آنتوسیانین کل در گیاه اسطوخودوس گردید [17]. افزایش عملکرد گیاه، کاهش محتوای مالون دی آلدنید و افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی در گیاه ذرت در اثر کاربرد نانوذره روی تحت تنش شوری گزارش شد [15]. تغییرات اقلیمی و گرمایش کره زمین موجب کاهش بارندگی در مناطق خشک و نیمه خشک جهان مخصوصا ایران شده است و این امر موجب شده تا بخش وسیعی از ایران درگیر مساله خشکی و شوری منابع آبی و خاکی گردد. ادامه کشاورزی در چنین خاک هایی مستلزم دسترسی به ترکیباتی است که موجب کاهش اثرات تنش در گیاه شود. امروزه با پیشرفت علم و شناخته شدن اثرات مفید عناصر مختلف در کنترل تنش ها، لازم است تا مطالعات تکمیلی در خصوص تاثیر این عناصر و غلظت های مختلف آن ها در کنترل تنش شوری مورد بررسی قرار گیرد. لذا هدف از بررسی حاضر ارزیابی اثرات نانوذره های اکسید تیتانیوم و روی بر کاهش اثرات منفی تنش شوری بر گیاه دارویی بابونه می باشد.

۲- مواد و روش ها

در تحقیق حاضر تاثیر سه سطح تنش شوری کلرید سدیم (۰، ۷۵ و ۱۵۰ میلی مولار) و محلول پاشی با نانوذره های اکسید تیتانیوم و روی (Nano US company) [8] (غلظت های ۰، ۲ و ۴ میلی گرم در لیتر) بر رشد و برخی صفات فیزیولوژیک بابونه آلمانی، مورد بررسی قرار گرفت. این بررسی در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان انجام شد. تناوب نوری گلخانه در طول دوره رشد گیاه به صورت ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی بود. رطوبت نسبی گلخانه ۶۵٪ تا ۷۰٪، و میانگین دمای گلخانه ۲۵ درجه سانتی گراد در روز و ۲۰ درجه سانتی گراد در شب بود. بذر بابونه آلمانی از شرکت پاکان بذر اصفهان خریداری شد. برای جوانه زنی، بذور ابتدا در سینی کاشت دارای کوکوپیت کشت شد.

گیاهان در مرحله سه برگچه‌ای از سینی کشت به گلدان‌های ۵ لیتری حاوی پرلیت دانه متوسط منتقل شدند. در هر گلدان ۵ گیاه کاشته شد. از محلول نیم‌هولگند (pH: 5.5-5.7) برای تغذیه گیاهان استفاده شد. دو هفته بعد از سازگاری گیاهان با شرایط کشت هیدروپونیک، تنش شوری به گیاهان در مرحله ۴ تا ۵ برگی اعمال شد. اعمال تنش شوری به تدریج و با غلظت ۳۰ میلی‌مولار نمک آغاز و هر سه روز یک‌بار با اضافه کردن ۳۰ میلی‌مولار دیگر نمک، سطح شوری گلدان‌ها افزایش یافت و این روند تا رسیدن به سطح شوری ۱۵۰ میلی‌مولار نمک ادامه یافت. تغذیه گیاهان تا زمان برداشت گیاهان با محلول‌های حاوی نمک ادامه یافت. محلول‌پاشی اول با نانوذرات هم‌زمان با اعمال تنش شوری انجام شد و محلول‌پاشی دوم دو هفته بعد تکرار شد. سی و هشت روز بعد از آخرین محلول‌پاشی (هم‌زمان با باز شدن گل‌ها)، نمونه‌برداری از گیاهان برای مطالعه صفات مورد نظر انجام شد. لازم به ذکر است که از زمان انتقال نشاها به گلدان‌ها تا برداشت گیاهان، ۶۸ روز زمان لازم بود.

اندازه‌گیری وزن خشک گیاه و ریشه

بعد از خارج کردن گیاهان از بستر کشت، بخش هوایی گیاه از محل طوقه قطع شدند و سپس در دمای اتاق (۳۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد) خشک شدند. اندازه‌گیری وزن خشک گیاه با استفاده از ترازوی دیجیتال (BBI41, Boeco, Germany) انجام شد.

اندازه‌گیری محتوای کلروفیل

برای اندازه‌گیری محتوای کلروفیل، ۰/۵ گرم نمونه برگ‌ی در ۵ میلی‌لیتر دی‌متیل سولفوکساید به مدت ۴ ساعت در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا بی‌رنگ شود. جذب نمونه‌ها در طیف‌های نوری ۶۶۵ و ۶۴۸ نانومتر، به کمک اسپکتروفتومتر (T80 ساخت چین) قراعت شد [18]. محتوای کلروفیل a و b از رابطه $Chl\ a = 14.85A_{665} - 5.14A_{648}$ و $Chl\ b = 25.48A_{648} - 7.36A_{665}$ محاسبه شد. در رابطه فوق A میزان جذب نمونه بود.

اندازه‌گیری محتوای کاتالاز

۰/۵ گرم از نمونه‌ی برگ‌ی تازه بابونه با بافر فسفات پتاسیم سرد ۰/۱ مولار (pH: ۷/۵) و ۰/۵ میلی‌مولار EDTA مخلوط گردید. محلول حاصل در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه با ۱۵۰۰۰ g سانتریفیوژ شد. ۰/۰۵ میلی‌لیتر از محلول رویی با ۱/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۱ میلی‌مولار (pH: ۷) و ۱/۴۵ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر مخلوط و واکنش با افزودن ۰/۵ میلی‌لیتر پراکسید هیدروژن ۷۵ میلی‌مولار آغاز شد. کاهش در جذب در ۲۴۰ نانومتر در مدت یک دقیقه یادداشت برداری شد. از ضریب خاموشی ۰/۰۳۶ برای محاسبه محتوای کاتالاز استفاده شد [19].

محتوای پراکسید هیدروژن

۰/۲ گرم از برگ تازه بابونه در نیتروژن مایع ساییده شد و روی نمونه‌ی ساییده شده، ۵ میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید ۱٪ حجمی (حجمی/وزنی) اضافه شد. محلول حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ g سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ، ۰/۵ میلی‌لیتر از فاز رویی با ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۱۰ میلی‌مولار (pH: ۷/۵) و یک میلی‌لیتر یدید پتاسیم (یک مولار) مخلوط شد. جذب نمونه‌ها در ۳۹۰ نانومتر به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد [20].

اندازه‌گیری محتوای مالون دی‌آلدئید

۰/۲ گرم از نمونه‌های برگ‌ی بابونه در نیتروژن مایع ساییده شد. روی نمونه ساییده شده ۵ میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید ۱٪ حجمی (حجمی/وزنی) اضافه شد. محلول حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ g سانتریفیوژ شد. یک میلی‌لیتر از محلول رویی با ۴ میلی‌لیتر از مخلوط تیوباربیتریک اسید ۵٪ + تری کلرواستیک اسید ۲۰٪ مخلوط شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. بعد از این مرحله، نمونه‌ها روی یخ قرار داده شد تا فعالیت آنزیم متوقف شود. در مرحله بعد مخلوط به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ g سانتریفیوژ گردید و جذب نمونه‌ها توسط اسپکتروفتومتر (T80+, China) در ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد [21].

اندازه‌گیری محتوای پرولین

۰/۲ گرم نمونه برگ‌ی تازه بابونه در ازت مایع ساییده شد. روی نمونه ساییده شده ۵ میلی لیتر اسید سولفوسالسیلیک ۳٪ اضافه گردید. عصاره حاصل به مدت ۷ دقیقه با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید، سپس فاز مایع حاصل جدا شد. یک میلی لیتر از محلول رویی با همان حجم اسید نین هیدرین و یک میلی لیتر اسید گلاسیال مخلوط و نمونه‌ها همراه با محلول‌های استاندارد پرولین به مدت یک ساعت در حمام آب در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. بعد از یک ساعت قرارگیری در حمام آب گرم نمونه‌ها بلافاصله به حمام یخ به مدت ۵ دقیقه منتقل شدند. بعد از خارج کردن نمونه‌ها از حمام یخ، روی آن‌ها ۲ میلی لیتر تولوئن اضافه شد و به مدت ۳۰ ثانیه تکان داده شد. در مرحله نهایی، نمونه‌ها ۳۰ دقیقه در وضعیت سکون قرار گرفتند. بعد از تشکیل فاز قرمز، حدود ۱۰۰۰ میکرولیتر برداشته شد و محتوای پرولین اندازه‌گیری شد [22].

محتوای پروتئین کل

برای اندازه‌گیری محتوای پروتئین، ۰/۵ گرم برگ تازه در ۵ میلی لیتر بافر تریس گلايسین به مدت ۱۰ دقیقه ساییده شد. سپس فاز رویی جدا و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد. به ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره حاصل ۵ میلی لیتر محلول برادفورد اضافه و ۱۰ دقیقه ورتکس شد. جذب نمونه‌ها در ۵۹۵ نانومتر توسط اسپکتوفتومتر قراعت شد. محتوای پروتئین بر مبنای منحنی استاندارد آل‌بومن تعیین شد [23].

ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی

ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی با بررسی فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH توسط عصاره گیاهی انجام شد. برای این منظور ابتدا عصاره متانولی از نمونه‌ها در غلظت‌های ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸ و ۱ میلی گرم در میلی لیتر تهیه شد. سپس ۲/۵ میلی لیتر از هر عصاره با ۱ میلی لیتر محلول DPPH (غلظت 3×10^{-4} مولار) مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت. سپس جذب نمونه‌ها در ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری شد. از اسید اسکوربیک (با غلظت‌های ۰، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲، ۵، ۸ و ۱۲ میکروگرم بر میلی لیتر) به عنوان استاندارد استفاده شد. درصد مهار نمونه‌ها از فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{درصد مهار} = (\text{جذب محلول شاهد} - \text{نمونه مورد نظر} / \text{جذب شاهد}) \times 100$$

سپس IC_{50} نمونه‌ها و اسید اسکوربیک محاسبه شد. IC_{50} به عنوان غلظتی از عصاره است که موجب کاهش غلظت اولیه DPPH تا ۵۰٪ می‌شود تعریف می‌شود [24].

اندازه‌گیری عناصر برگ

برای اندازه‌گیری محتوای عناصر، ابتدا یک گرم از پودر خشک شده برگ بابونه در کوره الکتریکی در دمای ۴۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ ساعت قرار گرفت، تا نمونه‌ها به خاکستر تبدیل شوند. به هر نمونه، ۲۰ میلی لیتر اسید نیتریک یک نرمال اضافه شد. مخلوط حاصل، به دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد در حمام آب گرم منتقل گردید تا اسید تبخیر شود. نمونه هضم شده با ۱۰۰ میلی لیتر آب دوبار تقطیر مخلوط گردید و در مرحله بعد صاف شد. از روش فلاپم‌فتمتری (Corning, 410, England) برای اندازه‌گیری محتوای عناصر سدیم و پتاسیم، دستگاه جذب اتمی (Corning, 410, England)، برای اندازه‌گیری محتوای آهن و روی و از روش کج‌لدال برای اندازه‌گیری محتوای نیتروژن برگ بابونه استفاده شد. محتوای فسفر به روش رنگ سنجی و انادات مولیبدات تعیین شد (AOAC, 1990).

طرح آزمایشی و آنالیز داده‌های آماری

تجزیه داده‌ها با استفاده از آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی در نرم افزار SAS انجام گردید و میانگین داده‌های حاصل از سه تکرار با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ در نرم افزار SPSS مقایسه گردید.

۳- نتایج و بحث

وزن خشک بخش هوایی گیاه و گل

نتایج نشان داد که وزن خشک گیاه و گل تحت تاثیر اثرات متقابل تنش شوری و محلول‌پاشی قرار گرفت (جدول ۱). براساس نتایج حاصل بیش‌ترین وزن خشک بخش هوایی گیاه در تیمار بدون تنش شوری با محلول‌پاشی ۴ میلی‌گرم در لیتر نانوذره اکسیدروی و اکسیدتیتانیوم و تیمار شوری ۷۵ میلی‌مولار کلریدسديم با محلول‌پاشی ۴ میلی‌گرم در لیتر نانوذره اکسیدروی حاصل شد. هر دو غلظت مورد بررسی نانوذره‌های اکسیدروی و تیتانیوم، در شرایط بدون تنش شوری موجب افزایش وزن خشک گل شد (جدول ۲). وزن خشک ریشه نیز تحت تاثیر محلول‌پاشی قرار گرفت (جدول ۱). نتایج نشان داد که بیش‌ترین وزن خشک ریشه در تیمار ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر نانوذره اکسیدروی و ۲ میلی‌گرم در لیتر اکسید تیتانیوم مشاهده شد. تفاوتی بین وزن خشک ریشه بین تیمار شاهد (بدون محلول‌پاشی) و محلول‌پاشی با ۴ میلی‌گرم در لیتر نانوذره اکسیدتیتانیوم مشاهده نشد (شکل ۱). شوری خاک با تاثیر منفی بر جذب آب، فعالیت فتوسنتزی گیاه (بسته شدن روزنه در اثر عدم توازن یونی ایجادشده)، ایجاد تنش اسمزی، ممانعت از جذب و انتقال ازت و تولید گونه‌های فعال اکسیژن موجب کاهش رشد گیاه می‌شود [25]–[27]. نتایج بررسی انجام‌شده در زینان نشان داد که استفاده از نانوذره اکسیدتیتانیوم موجب بهبود صفات رشدی، فعالیت آنزیمی و محتوای کلروفیل گیاه شد [28]. در گیاه سرخارگل کاربرد نانوذره تیتانیوم تحت تنش شوری ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر کلریدسديم موجب افزایش وزن خشک گیاه شد [29]. افزایش تعداد گل (از ۵ به ۹ عدد) و وزن خشک گیاه اطلسی، در اثر محلول‌پاشی با ۱۵ میلی‌گرم در لیتر نانوذره اکسیدتیتانیوم گزارش شده است [30]. بررسی اثرات تنش شوری و محلول‌پاشی با نانوذره روی در بادرشی نشان داد که محلول‌پاشی نقش مهمی در کنترل تنش شوری و افزایش عملکرد گیاه، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و محتوای کلروفیل گیاه را داشت [9]. روی یکی از عناصر غذایی ضروری مورد نیاز گیاه است که نقش مهمی در پایداری سلول، بیوسنتز کلروفیل، پروتئین، فعال‌سازی آنزیم و تولید هورمون اکسین دارد و به این طریق موجب رشد گیاه و افزایش مقاومت آن در برابر تنش می‌شود [31]. تیتانیوم با کمک به جذب عناصر غذایی موجب افزایش رشد و عملکرد گیاه می‌شود [30]. چنین به نظر می‌رسد که کاربرد نانوذرات نقش مهمی در رشد گیاه تحت شرایط تنش شوری را داشته باشند.

محتوای کلروفیل

اثرات متقابل تیمارهای آزمایشی محتوای کلروفیل را تحت تاثیر قرار داد (جدول ۱). محلول‌پاشی با غلظت‌های ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر نانوذره اکسیدروی و تیتانیوم در شرایط بدون تنش شوری (۱/۳–۱/۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) و تیمارهای محلول‌پاشی با ۴ میلی‌گرم در لیتر نانوذره اکسیدروی و ۲ میلی‌گرم در لیتر اکسیدتیتانیوم تحت تنش ۷۵ میلی‌مولار کلریدسديم موجب افزایش محتوای کلروفیل a به ۱/۲ میلی‌گرم بر گرم وزن تر شد. بیش‌ترین محتوای کلروفیل b (۱/۰ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) در تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر نانوذره اکسید تیتانیوم در شرایط بدون تنش شوری و کم‌ترین محتوای کلروفیل b (۰/۳ میلی‌گرم در گرم وزن تر) در تیمار تنش شوری ۱۵۰ میلی‌مولار کلریدسديم در شرایط بدون محلول‌پاشی مشاهده شد که نشان‌دهنده تاثیر منفی تنش بر محتوای کلروفیل b بود (جدول ۲). تجمع یون‌های سدیم و کلر تحت تنش شوری موجب تسريع فرآیند پیری برگ، کاهش تعداد سلول، کاهش فتوسنتز و جذب کربن توسط گیاه می‌شود [32]. کاهش نفوذپذیری CO₂، کاهش غلظت CO₂ به دلیل بسته شدن روزنه‌ها، تسريع در فرآیند پیری برگ، تخریب ساختمان کلروپلاست و دستگاه فتوسنتزی، فتواکسیداسیون کلروفیل‌ها و ممانعت از بیوسنتز کلروفیل‌های جدید، تغییر فعالیت آنزیم‌ها به دلیل تغییرات ساختاری سیتوپلاسم و در نهایت کاهش مقدار کلروفیل از اثرات منفی تنش شوری بر گیاه است [7]. مبارزه با اثرات منفی تنش در گیاهان مستلزم صرف انرژی اضافی است. کاهش بیوسنتز کلروفیل تحت شرایط تنش شاید به دلیل تبدیل گلوتامات (پیش‌ماده ساخت کلروفیل) به پرولین است که در نهایت موجب کاهش بیوسنتز کلروفیل می‌شود [33]. نتایج بررسی انجام‌شده در بابونه نشان داد که تنش شوری موجب کاهش محتوای کلروفیل گیاه شد [34]. محلول‌پاشی با نانوذره تیتانیوم تحت تنش شوری در گیاه زینان، موجب بهبود عملکرد و محتوای کلروفیل گیاه شد که دلیل آن بهبود فتوسنتز گیاه از طریق افزایش جذب عناصر غذایی مانند روی و آهن می‌باشد [28]. نتایج تحقیق انجام‌شده در گیاه بادرشی نشان داد که کاربرد نانوذره روی تحت تنش شوری موجب افزایش محتوای کلروفیل گیاه شد [9]. روی با نگهداری سطح مناسب عنصر پتاسیم در گیاه تحت شرایط تنش شوری در سلول‌های محافظ روزنه نقش مهمی در تنظیم میزان باز بودن روزنه داشته و به تنظیم فتوسنتز در گیاه کمک می‌کند [8]، [31].

جدول ۱- تجزیه واریانس تاثیر تنش شوری و محلول پاشی با نانوذره اکسید روی و تیتانیوم بر بیوماس و محتوای کلروفیل بابونه

(*Matricaria chamomilla*)

Table 1- ANOVA for the effects of salinity stress and foliar application with nano TiO₂ and ZnO on biomass and chlorophyll content of *Matricaria chamomilla*.

Source of Variation	df	Chlorophyll a	Chlorophyll b	Aerial Part Dry Weight	Root Dry Weight	Flower Dry Weight
Salinity (A)	2	0.43*	0.24*	19*	0.18 ^{ns}	14*
Foliar spray (B)	4	1.9*	0.49*	18**	1.1*	17*
A × B	8	0.96*	0.28*	8.6*	0.2 ^{ns}	39**
Error	30	0.24	0.19	1.8	0.28	0.78
Coefficient of variation (%)	12	13	8	4.8	6.7	

ns, * and ** indicate no significant difference and significant differences at 5 and 1% probability levels, respectively.

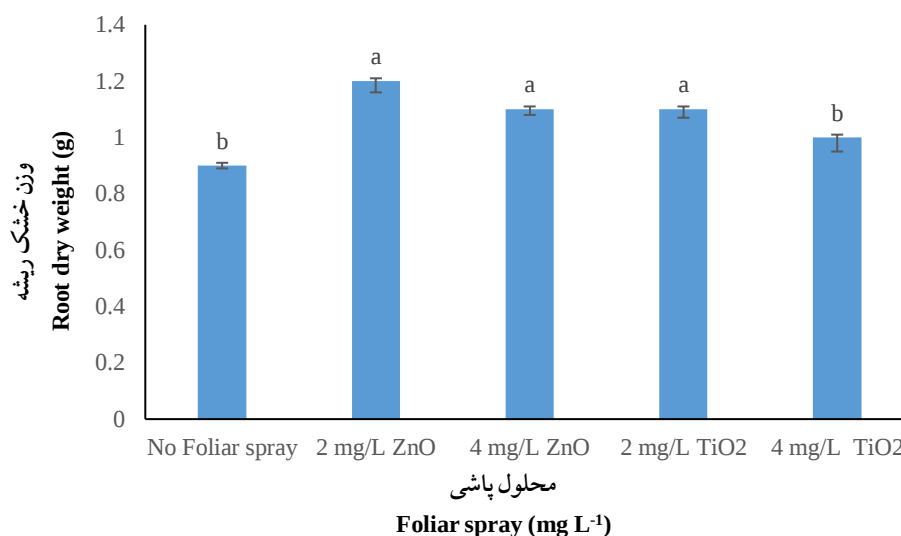
جدول ۲- مقایسه میانگین اثرات متقابل تنش شوری و محلول پاشی با نانوذره اکسید روی و اکسید تیتانیوم بر

وزن خشک و محتوای کلروفیل گیاه بابونه (*Matricaria chamomilla*)

Table 2- Mean comparison for the interaction effects of salinity stress and foliar application with nano TiO₂ and ZnO on plant dry weight and chlorophyll content of *Matricaria chamomilla*.

Salinity (mM)	Foliar Spray (mg L ⁻¹)	Chlorophyll a (mg g ⁻¹ FW)	Chlorophyll b (mg g ⁻¹ FW)	Aerial Part Dry Weight (g)	Flower Dry Weight (Per Pot)
No salinity	zero	1.0 ^c	0.7 ^c	1.9 ^e	0.59 ^c
No salinity	2 : Nano ZnO	1.5 ^a	0.9 ^b	4.0 ^b	1.21 ^a
No salinity	4 : Nano ZnO	1.3 ^a	0.9 ^b	4.7 ^a	1.30 ^a
No salinity	2 : Nano TiO ₂	1.3 ^a	1.0 ^a	4.0 ^b	1.10 ^a
No salinity	4 : Nano TiO ₂	1.4 ^a	0.9 ^b	4.9 ^a	1.30 ^a
75	zero	0.8 ^d	0.6 ^d	1.4 ^e	0.51 ^c
75	2 : Nano ZnO	0.9 ^{cd}	0.7 ^c	2.2 ^d	0.70 ^b
75	4 : Nano ZnO	1.2 ^a	0.85 ^{bc}	4.3 ^{ab}	0.72 ^b
75	2 : Nano TiO ₂	1.2 ^a	0.80 ^c	2.5 ^d	0.70 ^b
75	4 : Nano TiO ₂	1.1 ^b	0.7 ^c	2.3 ^d	0.68 ^b
150	zero	0.7 ^d	0.3 ^f	0.9 ^f	0.30 ^d
150	2 : Nano ZnO	0.9 ^d	0.5 ^e	1.1 ^f	0.41 ^d
150	4 Nano ZnO	0.9 ^{cd}	0.6 ^d	1.0 ^e	0.42 ^d
150	2 : Nano TiO ₂	1.0 ^c	0.8 ^c	1.1 ^e	0.42 ^d
150	4 : Nano TiO ₂	1.0 ^c	0.7 ^c	0.9 ^{ef}	0.43 ^d

*Significant differences among treatments are indicated by the different Latin letters based on Duncans test (P≤5%). The data of mean comparison table is the results of three replications.



شکل ۱- مقایسه میانگین تاثیر اکسید روی و تیتانیوم محلول پاشی با نانوذره بروزن خشک ریشه

گیاه بابونه (*Matricaria chamomilla*)

(تفاوت معنی دار بین تیمارها با حروف متفاوت لاتین براساس آزمون دانکن (P≤ ٪۵) نشان داده شد. داده‌های جدول مقایسه میانگین حاصل از سه تکرار می‌باشند.)

Figure 1- Mean comparison for the effects of foliar application with nano TiO₂ and ZnO on root dry weight of *Matricaria chamomilla*.

محتوای پروتئین تحت تاثیر اثرات متقابل تیمارهای آزمایشی قرار گرفت (جدول ۳) براساس نتایج حاصل بیش‌ترین محتوای پروتئین در تیمار محلول‌پاشی با ۴ میلی‌گرم در لیتر نانوذره اکسید روی در شرایط تنش شوری ۷۵ میلی‌مولار کلرید سدیم و محلول‌پاشی با غلظت‌های ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر نانوذره اکسیدتیتانیوم در شرایط بدون تنش شوری مشاهده شد. با افزایش تنش شوری به ۱۵۰ میلی‌مولار، تیمارهای مورد استفاده در محلول‌پاشی قادر به کنترل اثرات منفی تنش بر محتوای پروتئین گیاه نبود (جدول ۴). محتوای پروتئین تحت تاثیر اثرات مستقل تیمارهای آزمایشی قرار گرفت (جدول ۳). براساس نتایج حاصل محلول‌پاشی با غلظت‌های ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر نانوذره‌های اکسید تیتانیوم و روی موجب افزایش محتوای پروتئین گیاه شد (شکل ۲). با افزایش تنش شوری به ۱۵۰ میلی‌مولار بر محتوای پروتئین گیاه افزوده شد (شکل ۳.۱) افزایش در محتوای پروتئین گیاه بادرشی تحت تنش ۱۵۰ میلی‌مولار کلرید سدیم در شرایط بدون محلول‌پاشی با نانوذره روی گزارش شد [9]. روی نقش مهمی در تقویت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیر آنزیمی گیاه از طریق حذف یا کنترل تولید رادیکال‌های آزاد را دارد [7]، [31]. پروتئین نقش مهمی در حفظ پتانسیل اسمزی سلول، جلوگیری از جذب یون‌های سدیم و کلر تحت شرایط تنش را دارد. تحت شرایط تنش، سلول از پروتئین به‌عنوان منبع کربن و نیتروژن استفاده می‌کند و نقش مهمی در از بین بردن رادیکال‌های آزاد اکسیژن را دارد [35]. دی‌اکسید تیتانیوم از طریق افزایش پروتئین و تحریر سیستم آنتی‌اکسیدانی موجب حفاظت گیاه در برابر تنش اسمزی و اکسیداتیو ناشی از تنش شوری را می‌شود [28]. سنتز پروتئین، یکی از مکانیسم‌های متأثر شده از تنش شوری می‌باشد. شوری با تغییر در بیان ژن و الگوی بیان پروتئین در طی نمو گیاه موجب مقاومت گیاه در مقابل تنش می‌شود. با افزایش میزان تنش شوری به دلیل افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و افزایش فعالیت آنزیم پروتئاز، پراکسیداسیون پروتئین‌ها افزایش می‌یابد [36]. نتایج حاصل از بررسی حاضر نیز نشان‌دهنده کاهش غلظت پروتئین (به‌غیر از تیمار ۷۵ میلی‌مولار کلرید سدیم با محلول‌پاشی ۴ میلی‌گرم در لیتر نانوذره روی) حتی در شرایط محلول‌پاشی با هر دو نانوذره در پاسخ به تنش شوری می‌باشد. تحت تنش شوری محلول‌پاشی با نانوذره روی در شبلیله موجب افزایش غلظت پروتئین در گیاه شد [37] که با نتایج حاصل از بررسی حاضر مطابقت دارد.

جدول ۳- تجزیه واریانس تاثیر تنش شوری و محلول‌پاشی با نانوذره اکسید روی و

تیتانیوم بر محتوای پروتئین و پروتئین گیاه بابونه (*Matricaria chamomilla*).

Table 3- ANOVA for the effects of salinity stress and foliar application with nano TiO₂ and ZnO on protein and proline of *Matricaria chamomilla*.

Source of Variation	df	Protein Content	Proline Content
Salinity (A)	2	5647*	5.6*
Foliar spray (B)	4	2361*	4.9**
A × B	8	6854**	0.78ns
Error	30	874	0.74
Coefficient of variation (%)	11		3.8

ns, * and ** indicate no significant difference and significant differences at 5 and 1% probability levels, respectively

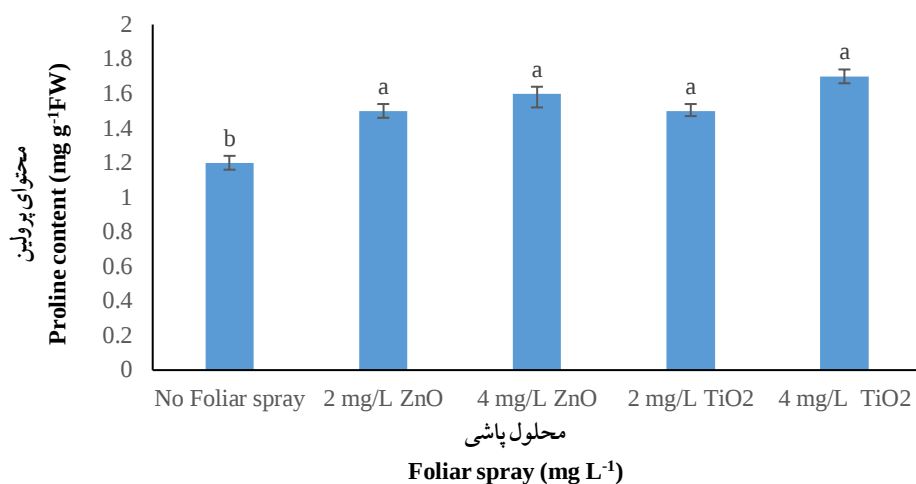
جدول ۴- مقایسه میانگین اثرات متقابل تنش شوری و محلول‌پاشی با نانوذره اکسید روی و تیتانیوم بر محتوای

پروتئین، پراکسید هیدروژن و فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاه بابونه (*Matricaria chamomilla*).

Table 4- Mean comparison for the interaction effects of salinity stress and foliar application with nano TiO₂ and ZnO on protein, H₂O₂ content and catalase activity of *Matricaria chamomilla*.

Salinity (mM)	Foliar Spray (mg L ⁻¹)	Protein Content (mg g ⁻¹ FW)	Catalase Activity (μmol H ₂ O ₂ mg ⁻¹ protein min ⁻¹)	H ₂ O ₂ Content (μmol g ⁻¹ FW)
No salinity	zero	151 ^c	27 ^e	8.6 ^e
No salinity	2 : Nano ZnO	165 ^b	31 ^d	7.6 ^e
No salinity	4 : Nano ZnO	178 ^b	33 ^d	8.1 ^e
No salinity	2 : Nano TiO ₂	190 ^a	28 ^d	7.2 ^e
No salinity	4 : Nano TiO ₂	191 ^a	30 ^d	7.0 ^f
75	zero	152 ^c	35 ^c	19 ^c
75	2 : Nano ZnO	159 ^c	37 ^c	14 ^d
75	4 : Nano ZnO	185 ^a	36 ^c	12 ^d
75	2 : Nano TiO ₂	157 ^c	39 ^b	14 ^d
75	4 : Nano TiO ₂	149 ^d	37 ^c	17 ^c
150	zero	143 ^d	39 ^b	29 ^a
150	2 : Nano ZnO	151 ^d	45 ^a	23 ^b
150	4 Nano ZnO	159 ^c	45 ^a	22 ^b
150	2 : Nano TiO ₂	148 ^d	43 ^a	22 ^b
150	4 : Nano TiO ₂	139 ^e	42 ^a	20 ^b

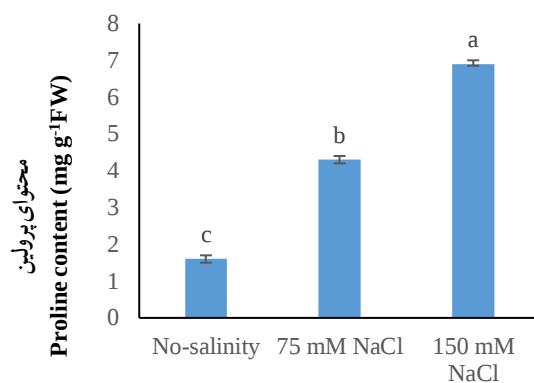
*Significant differences among treatments are indicated by the different Latin letters based on Duncan's test (P≤5%). The data of mean comparison table is the results of three replications.



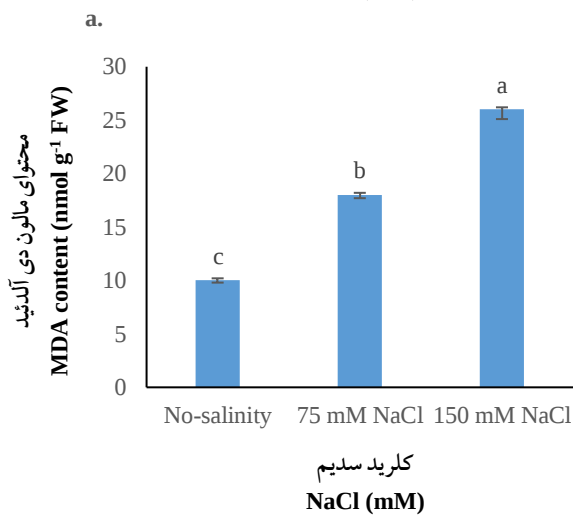
شکل ۲- مقایسه میانگین تاثیر محلول پاشی با نانوذره اکسید روی و تیتانیوم بر محتوای پرولین گیاه بابونه (*Matricaria chamomilla*)

(تفاوت معنی دار بین تیمارها با حروف متفاوت لاتین براساس آزمون دانکن ($P \leq 0.05$) نشان داده شد. داده‌های جدول مقایسه میانگین حاصل از سه تکرار می‌باشند.)

Figure 2- Mean comparison for the effects of foliar spray with nano TiO₂ and ZnO on proline content of *Matricaria chamomilla*.

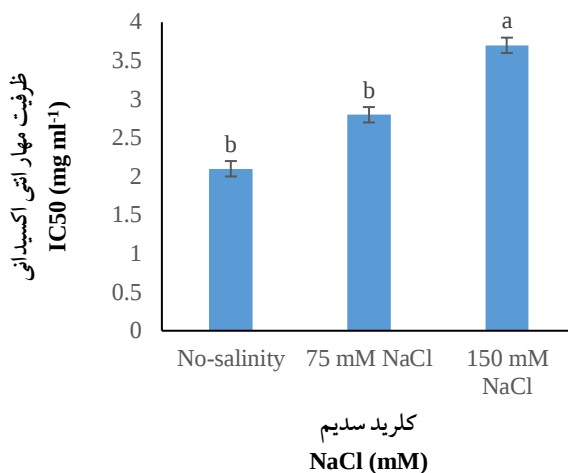


کلرید سدیم
NaCl (mM)



کلرید سدیم
NaCl (mM)

b.



c.

شکل ۳- مقایسه میانگین تاثیر تنش شوری بر: a- محتوای پرولین، b- مالون دی آلدئید، c- اثرات مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد گیاه بابونه (*Matricaria chamomilla*).
(تفاوت معنی‌دار بین تیمارها با حروف متفاوت لاتین براساس آزمون دانکن ($P \leq 0.05$) نشان داده شد. داده‌های جدول مقایسه میانگین حاصل از سه تکرار می‌باشند.)

Figure 3- Mean comparison for the effects of salinity stress on; a. proline, b. MDA content, c. IC_{50} index of *Matricaria chamomilla*.

محتوای مالون دی آلدئید و پراکسید هیدروژن

تنش شوری ۱۵۰ میلی‌مولار در شرایط بدون محلول‌پاشی موجب افزایش محتوای پراکسید هیدروژن (۲۹ میکرومول بر گرم وزن‌تر) در گیاه شد و کم‌ترین محتوای پراکسید هیدروژن (۷ میکرومول بر گرم وزن‌تر) در تیمار بدون تنش شوری با محلول‌پاشی ۴ میلی‌گرم در لیتر اکسیدتیتانیوم مشاهده شد (جدول ۴). محتوای مالون دی آلدئید تحت تاثیر اثر مستقل تنش شوری قرار گرفت (جدول ۵) و براساس نتایج حاصل از شکل ۴، تنش شوری ۱۵۰ میلی‌مولار کلرید سدیم، محتوای مالون دی آلدئید (۲۵ نانومول بر گرم وزن‌تر) گیاه را افزایش داد (شکل ۳.۵). تنش شوری از طریق تجمع یون‌های سدیم، کلر و سولفات در سطح سلولی و ایجاد عدم توازن یونی و غذایی موجب تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن در سلول شده که در صورت ادامه روند موجب آسیب به سلول می‌شود. افزایش در محتوای مالون دی آلدئید در اثر تنش شوری در گیاه زینان [28] و بادرشبی [9] گزارش شد. گیاهان در مواجهه با تنش‌های زیستی و غیرزیستی رادیکال‌های آزاد در سطح سلولی تولید می‌کنند که موجب شروع سلسله واکنش‌هایی می‌شوند که موجب آسیب به پروتئین، چربی و اسیدهای هسته‌ای می‌شود که در صورت ادامه موجب تخریب غشای سلول و افزایش محتوای مالون دی آلدئید می‌شود [7]. استفاده از تیتانیوم تحت چنین شرایطی با فعال‌کردن آنزیم‌های وابسته به آهن، مانند نیترات رداکتاز و سایر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی موجب کاهش آسیب وارده به سلول از طریق کاهش تولید رادیکال‌های آزاد می‌شود [29]، [13].

جدول ۵- تجزیه واریانس تاثیر تنش شوری و محلول‌پاشی با نانوذره اکسیدروی و تیتانیوم بر صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه بابونه (*Matricaria chamomilla*).

Table 5- ANOVA for the effects of salinity stress and foliar application with nano TiO_2 and ZnO on physiological and biochemical traits of *Matricaria chamomilla*.

Source of Variation	df	Calalase Activity	IC_{50} Index	H_2O_2 Content	MDA Content
Salinity (A)	2	26*	3.7**	27*	41*
Foliar spray (B)	4	18*	1.9*	39*	21 ^{ns}
A × B	8	26*	0.47 ^{ns}	38*	19 ^{ns}
Error	30	6.8	0.19	11	33
Coefficient of variation (%)		9.8	8	4.5	9.7

ns, * and ** indicate no significant difference and significant differences at 5 and 1% probability levels, respectively

فعالیت آنزیم کاتالاز

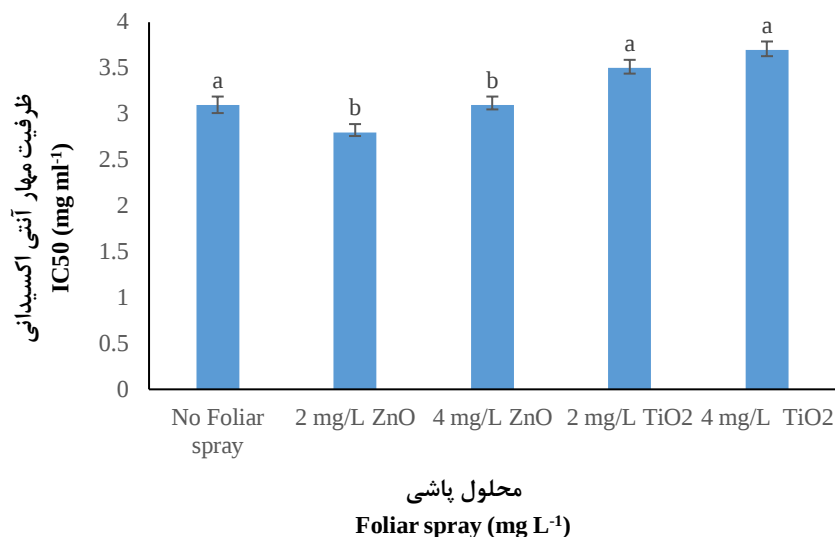
محلول پاشی با غلظت های ۲ و ۴ میلی گرم در لیتر نانوذره اکسید روی و تیتانیوم در تنش شوری ۱۵۰ میلی مولار کلرید سدیم موجب افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاه شد (جدول ۴). نتایج مشابهی در خصوص افزایش در فعالیت آنزیم کاتالاز در اثر محلول پاشی با نانوذره اکسید روی در بادرشبی گزارش شد [9]. در بررسی تاثیر تنش شوری و محلول پاشی با تیتانیوم در گوجه فرنگی مشخص شد که کاربرد نانوذره تیتانیوم موجب بهبود فعالیت آنزیم های سوپراکسید دیسموتاز، نیترات ردکتاز و کربونیک آنهیدراز گیاه شد [38]. روی نقش مهمی در افزایش محتوای آنزیم کاتالاز، حفظ تمامیت غشای پلاسمایی و کنترل جذب سدیم و سایر یون های سمی در گیاه را دارد. تحت شرایط تنش، بیوسنتز پروتئین در گیاه کاهش یافته و موجب کاهش بیوسنتز آنزیم ها مخصوصا کاتالاز می شود [39]. کاربرد روی تحت تنش شوری از گروه سولفدریل پروتئین های غشا در مقابل آسیب اکسیداتیو محافظت می کند و به این طریق به حفظ تمامیت غشای سلول و بیوسنتز آنزیم ها کمک می کند [7]. تنش های زیستی و غیرزیستی موجب تشدید تولید رادیکال های آزاد (پراکسید هیدروژن، هیدروکسیل و سوپراکسید) می شود. آنزیم های آنتی اکسیدانی مانند کاتالاز، پراکسیداز و اسکوربات پراکسیداز نقش مهمی در کاهش اثرات سو رادیکال های آزاد تولید شده در سلول های گیاهی را بر عهده دارند [40]. کاربرد نانوذرات تیتانیوم و روی موجب کاهش تنش اکسیداتیو و کاهش آسیب وارده به غشای سلول می شوند که این عمل را با افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی مانند سوپراکسید دیسموتاز انجام می دهند. آنزیم سوپراکسید دیسموتاز به عنوان اولین آنزیم از بین برنده رادیکال های آزاد تولید شده در اندامک های مختلف سلول شناخته شده است که موجب تبدیل رادیکال های اکسیژن منفرد به پراکسید هیدروژن و اکسیژن مولکولی می شود. در مرحله بعدی آنزیم های اسکوربات پراکسیداز و کاتالاز با تبدیل H_2O_2 به آب و مولکول اکسیژن موجب کاهش اثر تنش بر گیاه می شود [7]. افزایش در فعالیت آنزیم کاتالاز در اثر کاربرد نانوذرات در بررسی حاضر ممکن است به دلیل تاثیر این نانوذرات در کاهش محتوای پراکسید هیدروژن در گیاه باشد.

اثرات مهارکنندگی رادیکال های آزاد (مهار ۵۰ درصدی) (IC_{50})

تنش شوری صفر و ۷۵ میلی مولار کلرید سدیم دارای بیش ترین اثرات مهارکنندگی رادیکال های آزاد بود و تنش شوری ۱۵۰ میلی مولار دارای کم ترین اثرات مهارکنندگی بود (شکل 3.C). محلول پاشی با هر دو غلظت نانوذره اکسید روی موجب افزایش اثرات مهارکنندگی رادیکال های آزاد شد، در حالی که تاثیر نانوذره اکسید تیتانیوم در این خصوص مشابه تیمار شاهد بود (شکل 4). در تحقیق انجام شده در گوجه فرنگی مشخص شد که کاربرد نانوذره تیتانیوم تحت تنش شوری موجب بهبود صفات رشدی، محتوای کلروفیل برگ، فعالیت آنزیمی، محتوای فنل گیاه و خاصیت آنتی اکسیدانی گیاه شد [38]. در تحقیق دیگری در گوجه فرنگی مشخص شد که فعالیت آنتی اکسیدانی گیاه تحت تاثیر تنش شوری قرار گرفت و کاربرد اکسید تیتانیوم تاثیری در افزایش خاصیت آنتی اکسیدانی گیاه نداشت [41]. تنش شوری (۲۲۵ میلی مولار کلرید سدیم) و محلول پاشی (۳۰۰ میلی گرم در لیتر) نانوذره روی موجب افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی (مهار DPPH) گیاه شنبلیله شد که شاید دلیل آن نقش روی در بیوسنتز آنتی اکسیدان های آنزیمی و غیر آنزیمی باشد [37]. در این بررسی هم کاربرد نانوذره روی موجب افزایش مهار رادیکال های آزاد اکسیژن شد.

محتوای عناصر

محتوای عناصر پتاسیم، آهن، روی، سدیم و نسبت سدیم به پتاسیم تحت تاثیر اثرات متقابل تیمارهای آزمایشی، محتوای فسفر تحت تاثیر اثر مستقل تنش شوری و محتوای نیتروژن تحت تاثیر اثر مستقل تنش شوری و محلول پاشی قرار گرفت (جدول ۶).



شکل ۴- مقایسه میانگین تاثیر محلول پاشی با نانوذره اکسید روی و تیتانیوم بر ظرفیت مهار آنتی اکسیدانی گیاه بابونه (*Matricaria chamomilla*)

(تفاوت معنی دار بین تیمارها با حروف متفاوت لاتین براساس آزمون دانکن ($P \leq 5\%$) نشان داده شد. داده‌های جدول مقایسه میانگین حاصل از سه تکرار می‌باشند.)

Figure 4- Mean comparison for the effects of foliar application with nano TiO₂ and ZnO on IC₅₀ of *Matricaria chamomilla*.

جدول ۶- تجزیه واریانس تاثیر تنش شوری و محلول پاشی با نانوذره اکسید روی و تیتانیوم بر محتوای عناصر گیاه بابونه (*Matricaria chamomilla*)

Table 6- ANOVA for the effects of salinity stress and foliar application with nano -TiO₂ and nano-ZnO on concentration of some mineral nutrients in *Matricaria chamomilla*.

Source of Variation	df	N Content	P Content	K Content	Fe Content	Zn Content	Na Content	K/Na Ratio
Salinity (A)	2	132*	903547*	86*	358478*	47*	98*	15*
Foliar spray (B)	4	151*	19543 ^{ns}	121*	32154*	20 ^{ns}	18 ^{ns}	5.8*
A × B	8	0.84 ^{ns}	18474 ^{ns}	89*	12357*	26*	58**	9.3**
Error	30	12	244521	14.3	5471	21	19	1.9
Coefficient of variation (%)	11	7	12	13	8	9	11	

ns, * and ** indicate no significant difference and significant differences at 5 and 1% probability levels, respectively.

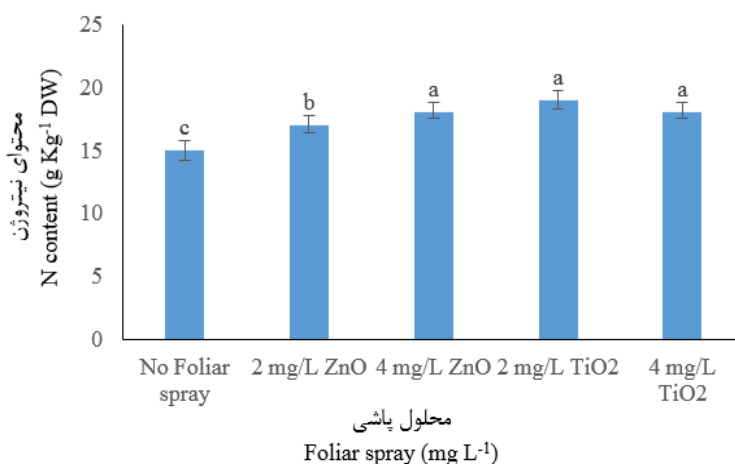
اثر مستقل تیمارهای آزمایشی محتوای نیتروژن و اثر مستقل شوری محتوای فسفر گیاه را تحت تاثیر قرار داد (جدول ۶). کمترین محتوای نیتروژن (۸/۱ گرم بر کیلوگرم وزن خشک) و فسفر (۳/۱ گرم بر کیلوگرم وزن خشک) در تنش شوری ۱۵۰ میلی مولار کلرید سدیم مشاهده شد و بیشترین محتوای هر دو عنصر در تیمارهای صفر و ۷۵ میلی مولار کلرید سدیم مشاهده شد (جدول ۷). محلول پاشی با ۴ میلی گرم در لیتر نانوذره اکسید روی، ۲ و ۴ میلی گرم در لیتر نانوذره اکسید تیتانیوم موجب افزایش محتوای نیتروژن گیاه شد (شکل ۵).

جدول ۷- مقایسه میانگین تاثیر تنش شوری بر محتوای نیتروژن و فسفر گیاه بابونه (*Matricaria chamomilla*)

Table 7- Mean comparison for the effects of salinity stress on N and P content of *Matricaria chamomilla*.

Salinity (mM)	N Content (g Kg ⁻¹ DW)	P Content (g Kg ⁻¹ DW)
0	14 ^a	4.2 ^a
75	11 ^{ab}	3.9 ^{ab}
150	8.1 ^c	3.1 ^b

Significant differences among treatments are indicated by the different Latin letters based on Duncan's test ($P \leq 5\%$). The data of mean comparison table is the results of three replications.



شکل ۵- مقایسه میانگین تاثیر محلول پاشی با نانوذره اکسید روی و تیتانیوم بر

محتوای نیتروژن گیاه بابونه (*Matricaria chamomilla*).

(تفاوت معنی دار بین تیمارها با حروف متفاوت لاتین براساس آزمون دانکن (P ≤ ۰.۰۵) نشان داده شد. داده‌های جدول مقایسه میانگین حاصل از سه تکرار می‌باشند.)

Figure 5- Mean comparison for the effects of foliar application with nano TiO₂ and ZnO on nitrogen content of *Matricaria chamomilla*.

بیشترین محتوای پتاسیم (۲۳ گرم در کیلوگرم وزن خشک) در تیمار بدون تنش شوری با محلول پاشی ۴ میلی‌گرم در لیتر نانوذره اکسید تیتانیوم مشاهده شد که نشان‌دهنده افزایش ۳۵ درصدی این عنصر نسبت به تیمار شاهد بود. در شرایط بدون تنش شوری محلول پاشی با ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر نانوذره تیتانیوم موجب افزایش محتوای آهن و محلول پاشی با ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر نانوذره روی، و ۴ میلی‌گرم در لیتر نانوذره تیتانیوم در شرایط بدون تنش شوری موجب افزایش محتوای روی گیاه شد. با افزایش تنش شوری بر محتوای سدیم گیاه افزوده شد و بالاترین محتوای سدیم تیمار ۱۵۰ میلی‌مولار کلرید سدیم در شرایط بدون محلول پاشی مشاهده شد که نشان‌دهنده افزایش ۲۴۸ درصدی نسبت به تیمار شاهد بود. شرایط بدون تنش شوری با محلول پاشی تیتانیوم موجب افزایش نسبت پتاسیم به سدیم شد (جدول ۸). سمیت سدیم و کلر با ایجاد اختلالات تغذیه‌ای و کاهش پتانسیل اسمزی محلول خاک، کاهش آب سلول و تورژسانس سلولی، موجب آغاز فرایندهای بیوشیمیایی در گیاه شده که منجر به خشکی فیزیولوژیکی گیاه می‌شود [42]. تجمع اضافی آنیون کلر موجب نکروزه شدن برگ، کاهش کارایی فتوسنتز و بازداري از جذب نیترات توسط گیاه می‌شود. تجمع اضافی سدیم به دلیل خاصیت آنتاگونیستی با پتاسیم موجب کاهش جذب پتاسیم شده و به این طریق موجب کاهش دسترسی گیاه به منابع از ته لازم می‌شود [43-45]. در بررسی انجام شده در گوجه‌فرنگی مشخص شد که تنش شوری موجب کاهش محتوای پتاسیم گیاه شد، اما کاربرد نانوذره تیتانیوم در چنین شرایطی موجب افزایش محتوای نیتروژن، فسفر، پتاسیم، کلسیم و منیزیم برگ شد [41]. نتایج مشابهی در خصوص افزایش جذب عناصر غذایی در اثر تیمار با تیتانیوم در گوجه‌فرنگی در شرایط بدون تنش شوری گزارش شد [46]. تیتانیوم تاثیر مثبت در آلی‌سازی نیتروژن از طریق افزایش تولید پروتئین‌های جدید مورد نیاز برای سمیت‌زدایی رادیکال‌های آزاد تولید شده در اثر تنش را دارد [47]. کاهش در محتوای پتاسیم و نسبت پتاسیم به سدیم تحت شرایط تنش شوری در رزماری گزارش شد. محلول پاشی با نانوذره روی در چنین شرایطی موجب افزایش جذب پتاسیم و بهبود نسبت پتاسیم به سدیم شد [47]. پتاسیم نقش مهمی در تنظیم پتانسیل اسمزی سلول‌های ریشه، انتقال مواد در آوند چوبی و توازن آبی گیاه را دارد و به عنوان فاکتور مقاومت گیاه در مقابل تنش شوری مطرح می‌باشد [7]. جایگزینی یون سدیم به جای یون کلسیم در دیواره سلولی تحت شرایط تنش موجب اختلال در کارکرد دیواره سلولی و تمامیت غشای سلول شده و به این طریق رشد و عملکرد گیاه را تحت تاثیر قرار می‌دهد [48]. محلول پاشی با نانوذره روی تحت شرایط تنش، تاثیر مثبت در حفظ تمامیت غشای سلول و فتوسنتز از طریق جذب و متابولیسم پتاسیم توسط گیاه داشته و به این طریق موجب کاهش جذب سدیم توسط گیاه می‌شود [49].

جدول ۸- مقایسه میانگین اثر متقابل تنش شوری و محلول پاشی با نانوذره اکسید روی و تیتانیوم بر محتوای عناصر (پتاسیم، آهن، روی، سدیم و نسبت پتاسیم به سدیم) در گیاه بابونه (*Matricaria chamomilla*).

Table 8- Mean comparison for the interaction effects of salinity stress and foliar application with nano TiO_2 and ZnO on concentration of some mineral nutrients (K, Fe, Zn, Na content and K/Na ratio) of *Matricaria chamomilla*.

Salinity (mM)	Foliar spray (mgL ⁻¹)	K content (g Kg ⁻¹ DW)	Fe content (mg Kg ⁻¹ DW)	Zn content (mg Kg ⁻¹ DW)	Na content (mg Kg ⁻¹ DW)	K/Na ratio
No salinity	zero	17 ^b	987 ^d	16 ^d	5.2 ^f	3.20 ^c
No salinity	2 : Nano ZnO	17.2 ^b	1001 ^c	26 ^a	4.9 ^j	3.50 ^c
No salinity	4 : Nano ZnO	17 ^b	1032 ^c	31 ^a	4.2 ^j	4.00 ^b
No salinity	2 : Nano TiO_2	19 ^b	1124 ^a	25 ^b	3.8 ^j	5.00 ^b
No salinity	4 : Nano TiO_2	23 ^a	1234 ^a	26 ^a	3.5 ^j	6.50 ^a
75	zero	14 ^d	845 ^e	13 ^f	11.0 ^d	1.18 ^d
75	2 : Nano ZnO	15 ^c	954 ^d	19 ^c	9.8 ^e	1.57 ^d
75	4 : Nano ZnO	15 ^c	897 ^e	22 ^b	8.4 ^e	1.80 ^d
75	2 : Nano TiO_2	17 ^b	1024 ^c	17 ^d	8.9 ^e	1.92 ^d
75	4 : Nano TiO_2	18 ^b	1135 ^b	16.2 ^d	8.8 ^e	2.06 ^d
150	zero	9.2 ^f	698 ^j	9.3 ^j	18.1 ^a	0.50 ^e
150	2 : Nano ZnO	10 ^f	741 ^f	15.7 ^e	15.2 ^b	0.66 ^e
150	4 Nano ZnO	10 ^f	703 ^f	18.2 ^c	14 ^b	0.71 ^e
150	2 : Nano TiO_2	12 ^e	987 ^d	14.1 ^e	13.3 ^c	0.92 ^e
150	4 : Nano TiO_2	13 ^d	1001 ^b	13.9 ^f	13.5 ^c	0.97 ^e

*Significant differences among treatments are indicated by the different Latin letters based on Duncans test ($P \leq 5\%$). The data of mean comparison table is the results of three replications.

۴- نتیجه گیری

نتایج حاصل از بررسی حاضر نشان داد که تنش شوری ۱۵۰ میلی مولار کلرید سدیم با افزایش محتوای مالون دی آلدئید، پراکسید هیدرون و اختلال در جذب عناصر غذایی موجب آسیب به گیاه شد. عملکرد بخش هوایی گیاه تحت تاثیر محلول پاشی با ۴ میلی گرم در لیتر نانوذره اکسید روی و تیتانیوم در شرایط بدون تنش شوری و ۴ میلی گرم در لیتر نانوذره اکسید روی در ۷۵ میلی مولار کلرید سدیم قرار گرفت. سایر صفات فیزیولوژیک مورد مطالعه در بررسی حاضر نیز تحت تاثیر اثرات منفی تنش شوری قرار گرفتند. در کل چنین می توان نتیجه گیری کرد که گیاه بابونه قادر به تحمل تنش شوری ۱۵۰ میلی مولار کلرید سدیم نبوده و محلول پاشی با نانوذره روی قادر به کنترل اثرات منفی تنش تا ۷۵ میلی مولار کلرید سدیم می باشد.

سپاسگزاری

از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان به خاطر تامین هزینه های این پژوهش تشکر و قدردانی می شود.

اعلام تعارض منافع

بدین وسیله اعلام می شود که مقاله حاضر حاصل کار تحقیقی اعضای دخیل در مقاله بوده است و نویسندگان هیچ گونه تعارض منافی ندارند.

منابع

- [1] Lim, T. K. (2014). *Matricaria chamomilla*. In *Edible medicinal and non-medicinal plants* (pp. 397–431). Dordrecht: Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-7395-0_25
- [2] dos Santos, D. S., de Souza Siqueira Barreto, R., Serafini, M. R., Gouveia, D. N., Marques, R. S., de Carvalho Nascimento, L., ... & Guimarães, A. G. (2019). Phytomedicines containing *matricaria* species for the treatment of skin diseases: a biotechnological approach. *Fitoterapia*, 138, 104267. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0367326X19309669>
- [3] El Mihyaoui, A., da Silva, J. C. G., Charfi, S., Candela Castillo, M. E., Lamarti, A., & Arnao, M. B. (2022). Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.): a review of ethnomedicinal use, phytochemistry and pharmacological uses. *Life*, 12(4). <https://www.mdpi.com/2075-1729/12/4/479>
- [4] Karami, A., & Sepehri, A. (2018). Nano titanium dioxide and nitric oxide alleviate salt induced changes in seedling growth, physiological and photosynthesis attributes of barley. *Zemdirbyste-agriculture*, 105(2). <https://pdfs.semanticscholar.org/64b1/1227d6f4f1ec13acb86680bfb382beb8a1ff.pdf>
- [5] Fatehi, S. F., Oraei, M., Gohari, G., Akbari, A., & Faramarzi, A. (2022). Proline-functionalized graphene oxide nanoparticles (Go-Pro Nps) mitigate salt-induced adverse effects on morpho-physiological traits and essential oils

- constituents in moldavian balm (*dracocephalum moldavica* L.). *Journal of plant growth regulation*, 41(7), 2818–2832. <https://doi.org/10.1007/s00344-021-10477-1>
- [6] Ganjavi, A. S., Oraei, M., Gohari, G., Akbari, A., & Faramarzi, A. (2021). Glycine betaine functionalized graphene oxide as a new engineering nanoparticle lessens salt stress impacts in sweet basil (*ocimum basilicum* L.). *Plant physiology and biochemistry*, 162, 14–26. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0981942821000954>
 - [7] Munns, R., & Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annual review of plant biology*, 59(Volume 59, 2008), 651–681. <https://www.annualreviews.org/content/journals/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911>
 - [8] Mehrabani, L. V., Hassanpouraghdam, M. B., & Shamsi-Khotab, T. (2018). The effects of common and nano-zinc foliar application on the alleviation of salinity stress in *Rosmarinus officinalis* L. *ACTA scientiarum polonorum hortorum cultus*, 17(6), 65–73. <https://czasopisma.up.lublin.pl/index.php/asphc/article/view/61>
 - [9] Esmaelpour, B., Shiekhalipour, M., & Torabi-Giglo, M. (2020). Effects of zinc nanoparticles on growth, some physiological characteristics, and essential oil yield of *dracocephalum moldavica* L. under salinity stress conditions. *Iranian journal of medicinal and aromatic plants research*, 36(5), 867–884. (In Persian). https://ijmapr.areeo.ac.ir/article_122921.html
 - [10] Dadkhah, A. R., & others. (2010). Effect of salt stress on growth and essential oil of *Matricaria chamomilla*. *Research journal of biological sciences*, 5(10), 643–646.
 - [11] El-Saadony, M. T., Almoshadak, A. S., Shafi, M. E., Albaqami, N. M., Saad, A. M., El-Tahan, A. M., ... & Helmy, A. M. (2021). Vital roles of sustainable nano-fertilizers in improving plant quality and quantity-an updated review. *Saudi journal of biological sciences*, 28(12), 7349–7359. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319562X2100718X>
 - [12] Farooq, T., Adeel, M., He, Z., Umar, M., Shakoor, N., da Silva, W., ... & Rui, Y. (2021). Nanotechnology and plant viruses: an emerging disease management approach for resistant pathogens. *ACS nano*, 15(4), 6030–6037. <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c10910>
 - [13] Abdel Latef, A. A. H., Srivastava, A. K., El-sadek, M. S. A., Kordrostami, M., & Tran, L. S. P. (2018). Titanium dioxide nanoparticles improve growth and enhance tolerance of broad bean plants under saline soil conditions. *Land degradation & development*, 29(4), 1065–1073. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ldr.2780>
 - [14] Daughan, H. I. (2018). Effects of TiO₂ nanoparticles on maize (*Zea mays* L.) growth, chlorophyll content and nutrient uptake. *Applied ecology and environmental research*, 16, 6873–6883.
 - [15] Chattha, M. U., Amjad, T., Khan, I., Nawaz, M., Ali, M., Chattha, M. B., ... & others. (2022). Mulberry based zinc nanoparticles mitigate salinity induced toxic effects and improve the grain yield and zinc bio-fortification of wheat by improving antioxidant activities, photosynthetic performance, and accumulation of osmolytes and hormones. *Frontiers in plant science*, 13, 1–16. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2022.920570/full>
 - [16] Dimkpa, C. O., McLean, J. E., Latta, D. E., Manangón, E., Britt, D. W., Johnson, W. P., ... & Anderson, A. J. (2012). Cu and Zn nanoparticles: phytotoxicity, metal speciation, and induction of oxidative stress in sand-grown wheat. *Journal of nanoparticle research*, 14(9), 1125. <https://doi.org/10.1007/s11051-012-1125-9>
 - [17] Mehrabani, L. V., Valizadeh Kamran, R., Hassanpouraghdam, M. B., & Pessarakli, M. (2017). Zinc sulfate foliar application effects on some physiological characteristics and phenolic and essential oil contents of *lavandula stoechas* L. under sodium chloride (NaCl) salinity conditions. *Communications in soil science and plant analysis*, 48(16), 1860–1867. <https://doi.org/10.1080/00103624.2017.1406105>
 - [18] Shinano, T., Lei, T. T., Kawamukai, T., Inoue, M. T., Koike, T., & Tadano, T. (1996). Dimethylsulfoxide method for the extraction of chlorophylls a and b from the leaves of wheat, field bean, dwarf bamboo, and OAK. *Photosynthetica*, 32(3), 409–415.
 - [19] Luhova, L., Lebeda, A., Hedererová, D., & Pec, P. (2003). Activities of amine oxidase, peroxidase and catalase in seedlings of *pisum sativum* L. under different light conditions. *Plant soil and environment*, 49(4), 151–157.
 - [20] Nareshkumar, A., Veeranagamallaiah, G., Pandurangaiah, M., Kiranmai, K., Amaranathareddy, V., Lokesh, U., ... & Sudhakar, C. (2015). Pb-stress induced oxidative stress caused alterations in antioxidant efficacy in two groundnut (*arachis hypogaea* L.) cultivars. *Agricultural sciences*, 6(10), 1283–1297.
 - [21] Heath, R. L., & Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of biochemistry and biophysics*, 125(1), 189–198. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003986168906541>
 - [22] Fedina, I., Georgieva, K., Velitchkova, M., & Grigorova, I. (2006). Effect of pretreatment of barley seedlings with different salts on the level of UV-B induced and UV-B absorbing compounds. *Environmental and experimental botany*, 56(3), 225–230. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0098847205000353>
 - [23] Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1), 248–254. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003269776905273>
 - [24] Zhang, D., & Hamauzu, Y. (2004). Phenolics, ascorbic acid, carotenoids and antioxidant activity of broccoli and their changes during conventional and microwave cooking. *Food chemistry*, 88(4), 503–509. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814604001517>
 - [25] Parida, A. K., & Das, A. B. (2004). Effects of NaCl stress on nitrogen and phosphorous metabolism in a true mangrove *Bruguiera parviflora* grown under hydroponic culture. *Journal of plant physiology*, 161(8), 921–928. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S017616170400015X>

- [26] Ashraf, M., Shahzad, Sh. M., Imtiaz, M., & Rizwan, M. Sh. (2018). Salinity effects on nitrogen metabolism in plants – focusing on the activities of nitrogen metabolizing enzymes: a review. *Journal of plant nutrition*, 41(8), 1065–1081. <https://doi.org/10.1080/01904167.2018.1431670>
- [27] Garg, N., Saroy, K., Cheema, A., & Bisht, A. (2019). Microbial diversity in soil: biological tools for abiotic stress management in plants. *Plant biotic interactions : state of the art* (pp. 283–321). Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-26657-8_17
- [28] Amooaghaie, R., Majidi, M., & Farhadian, S. (2022). Impact of nano-TiO₂ on salt stress tolerance of carum copticum. *Plant process and function*, 11(48). <http://jispp.iut.ac.ir/article-1-1560-en.html>
- [29] Behnam, H., Feizi, H., & Alipanah, M. (2021). Alleviation the effects of salinity stress using titanium dioxide nano and bulk particles in Echinacea seeds and seedlings. *Advances in horticultural science*, 35(4), 351–360.
- [30] Kamali, M., Shour, M., & Feizi, H. (2018). Impacts of nanosized and bulk titanium dioxide on flowering and morpho-physiological traits of petunia (petunia hybrida) under salinity stress. *Journal of horticultural science*, 32(2), 199–212. (In Persian). https://jhs.um.ac.ir/article_36490.html
- [31] Marschner, H. (1995). *Mineral nutrition of higher plants*. Elsevier Science. https://www.google.com/books/edition/Marschner_s_Mineral_Nutrition_of_Higher/yqKV3USG41cC?hl=en&gbpv=0
- [32] Parihar, P., Singh, S., Singh, R., Singh, V. P., & Prasad, S. M. (2015). Effect of salinity stress on plants and its tolerance strategies: a review. *Environmental science and pollution research*, 22(6), 4056–4075. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3739-1>
- [33] Drkaskiewicz, M. (1994). Chlorophyllase: occurrence, functions, mechanism of action, effects of external and internal factors. *Photosynthetica*, 30(3), 321–331. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/19950706776>
- [34] Rasekh, F., Rowshan, V., Vaziri, A., & Kholdebarin, B. (2019). Effects of salinity on biochemical and physiological characteristics of matricaria chamomilla. *Journal of plant research (Iranian journal of biology)*, 32(3), 583–595. (In Persian). https://plant.ijbio.ir/article_1376.html
- [35] Chrysargyris, A., Michailidi, E., & Tzortzakos, N. (2018). Physiological and biochemical responses of lavandula angustifolia to salinity under mineral foliar application. *Frontiers in plant science*, 9, 339208.
- [36] Pasandi Pour, A., Farahbakhsh, H., & Saffari, M. (2014). Response of fenugreek plants to short-term salinity stress in relation to lipid peroxidation, antioxidant activity and protein content. *Journal of ethno-pharmaceutical products*, 1(1), 45–52.
- [37] Noohpisheh, Z., Amiri, H., Mohammadi Gholami, A., & Farhadi, S. (2020). Investigating the application of ZnO nanoparticle on morphological and physiological parameters of two cultivars of Fenugreek (trigonella foenum-graecum L.) under salinity stress. *Plant process and function*, 9(35). <http://jispp.iut.ac.ir/article-1-1223-en.html>
- [38] Khan, M. N. (2016). Nano-titanium dioxide (nano-TiO₂) mitigates NaCl stress by enhancing antioxidative enzymes and accumulation of compatible solutes in tomato (Lycopersicon esculentum Mill.). *Journal of plant sciences*, 11(1-3), 1–11.
- [39] Khanna-Chopra, R., & Selote, D. S. (2007). Acclimation to drought stress generates oxidative stress tolerance in drought-resistant than -susceptible wheat cultivar under field conditions. *Environmental and experimental botany*, 60(2), 276–283. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0098847206001638>
- [40] Harinasut, P., Poonsopa, D., Roengmongkol, K., & Charoensataporn, R. (2003). Salinity effects on antioxidant enzymes in mulberry cultivar. *Science asia*, 29(2), 109–113.
- [41] Carbajal-Vázquez, V. H., Gómez-Merino, F. C., Alcántar-González, E. G., Sánchez-García, P., & Trejo-Téllez, L. I. (2022). Titanium increases the antioxidant activity and macronutrient concentration in tomato seedlings exposed to salinity in hydroponics. *Plants*, 11(8). <https://www.mdpi.com/2223-7747/11/8/1036>
- [42] Khan, N., Bano, A., & Babar, M. D. A. (2019). The stimulatory effects of plant growth promoting rhizobacteria and plant growth regulators on wheat physiology grown in sandy soil. *Archives of microbiology*, 201(6), 769–785. <https://doi.org/10.1007/s00203-019-01644-w>
- [43] Soussi, M., Ocana, A., & Lluch, C. (1998). Effects of salt stress on growth, photosynthesis and nitrogen fixation in chick-pea (Cicer arietinum L.). *Journal of experimental botany*, 49(325), 1329–1337.
- [44] Castorena, M. V., Valencia, E. A. C., Ibarra, M. A. I., & Ulery, A. L. (2006). Absorción y traslocación de sodio y cloro en plantas de chile fertilizadas con nitrógeno y crecidas con estrés salino. *Revista fitotecnica mexicana*, 29(1), 79–88.
- [45] Calderón-Paniagua, N., Estrada-Luna, A. A., & Martínez-Hernández, J. D. J. (2001). Efecto de la salinidad en el crecimiento y absorción nutrimental de plantas micropropagadas de nopal (Opuntia spp). *Revista chapingo: serie ciencias forestales y del ambiente*, 7(2), 127–132.
- [46] Kleiber, T., & Markiewicz, B. (2013). Application of “Tytanit” in greenhouse tomato growing. *Acta scientiarum polonorum. hortorum cultus*, 12(3), 117–126.
- [47] Cherchi, C., Lin, Y., & Gu, A. Z. (2021). Nano-Titanium dioxide exposure impacts nitrogen metabolism pathways in cyanobacteria. *Environmental engineering science*, 38(6), 469–480. <https://doi.org/10.1089/ees.2020.0150>
- [48] Cherchi, C., Lin, Y., & Gu, A. Z. (2020). Nano-titanium dioxide exposure impacts nitrogen metabolism pathways in cyanobacteria. *Environmental engineering science*, 38(6), 469–480. DOI:10.1089/ees.2020.0150
- [49] Tufail, A., Li, H., Naeem, A., & Li, T. X. (2018). Leaf cell membrane stability-based mechanisms of zinc nutrition in mitigating salinity stress in rice. *Plant biology*, 20(2), 338–345. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/plb.12665>

Paper Type: Original Article



Molecular Tracing of Caviar Obtained from Sturgeon Species to Identify the Original and Species of Sturgeon

Shirin Jamshidi^{1*}, Mohammad Hasanzadeh Saber¹, Maryam Monsef Shokri²

¹ Department of Genetics and Biotechnology, International Sturgeon Research Institute, Iran Fisheries Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran; jamshidi99@yahoo.com; Assistant Professor; jamshidi99@yahoo.com; Instructor, saber.merag@gmail.com.

² Department of Physiology and Biochemistry, International Sturgeon Research Institute, Iran Fisheries Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran; Assistant Professor, monsef_shokri@yahoo.com.

Citation:

Jamshidi, Sh., & Hasanzadeh Saber, M., & Monsef Shokri, M. (2023). Molecular tracing of caviar obtained from sturgeon species to identify the original and species of sturgeon. *The quarterly scientific journal of applied biology*, 36(3), 34-42.

Received: 13/04/2022

Accepted: 12/06/2023

Abstract

Introduction: Identifying the species of sturgeon, preventing the mixing of caviar from several sturgeon species in their made product is one of the most important challenges in the legal and international trade of this product. One of the ways to identify the original caviar and correctly label caviar products is to apply barcodes and especially molecular barcode tracking.

Methods: In this research, fin tissue samples of Russian and Persian sturgeon, Ship, Sterlet, stellate, Siberian and beluga, as well as their caviar samples, were used to investigate species identification markers of Caspian Sea sturgeon. DNA extraction was performed from three caviar eggs of each species and pure sturgeons fin tissue, and two types of primers were selected based on mitochondrial genes.

Results: The COI gene amplified by PCR using the ACoI F/R primer set showed the presence of a 138 nucleotide fragment in the sturgeon species only, but the species-specific marker amplified different sized fragments based on D-loop gene. These fragments were reproduced in both caviar and fin tissue of sturgeons. The overall results showed that the amplified fragment of the sturgeon marker and the species-specific marker in pure sturgeons can indicate the pure fish species.

Conclusion: The low diversity and abundance of food items in the cave habitat implies a more intense competition for food in the cave's unique environment with low energy resources. The presence of various-sized prey among the food items indicates an opportunistic feeding habit in this toad, as well.

Keywords: Molecular barcoding, Caviar, Mitochondrial gene, COI, D-loop,



Corresponding Author: jamshidi99@yahoo.com



<https://doi.org/10.22051/jab.2023.42758.1545>

ردیابی مولکولی خاویار استحصال شده از گونه‌های تاسماهیان برای تشخیص اصل و نوع خاویار

شیرین جمشیدی^{۱*}، محمد حسن زاده صابر^۱، مریم منصف شکری^۲

^۱ استادیار، گروه ژنتیک و بیوتکنولوژی، انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی

کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، رشت، ایران.

^۲ استادیار، گروه فیزیولوژی و بیوشیمی، انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری، موسسه تحقیقات علوم

شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، رشت، ایران.

چکیده

مقدمه: تشخیص گونه تاسماهیان، جلوگیری از آمیختگی خاویار چندگونه در محصولات تهیه شده از آن‌ها از چالش‌های بسیار مهم در تجارت قانونی و بین‌المللی این محصولات می‌باشد. یکی از روش‌های شناسایی خاویار اصل و برچسب‌گذاری صحیح محصولات خاویار، استفاده از بارکدها و به‌ویژه ردیابی با بارکد مولکولی می‌باشد.

روش‌ها: در این تحقیق برای بررسی نشانگرهای تشخیص گونه‌ای تاسماهیان دریای کاسپین از نمونه‌های بافت باله تاسماهی روسی، ایرانی، شیپ، استرلیاد، ازون‌برون و فیل‌ماهی خالص دریای کاسپین، استرلیاد و تاسماهی سیبری و هم‌چنین نمونه خاویار آن‌ها استفاده شد. استخراج DNA از سه دانه خاویار از هرگونه و بافت باله تاسماهی خالص انجام شد و دو نوع آغازگر بر اساس ژن‌های میتوکندریایی انتخاب شد.

یافته‌ها: تکثیر ژن COI با استفاده از روش PCR با جفت پرایمر ACOI یک قطعه ۱۳۸ نوکلئوتیدی را تنها در تمامی گونه‌های ماهیان خاویاری نشان داد؛ اما نشانگر گونه‌ای قطعاتی با اندازه‌های متفاوت بر اساس ژن D-loop را تکثیر کرد. این قطعات هم در خاویار و هم بافت باله تاسماهیان تکثیر شد.

نتیجه‌گیری: نتایج کلی نشان داد که تکثیر قطعات نشانگر تاسماهیان و نشانگر گونه‌ای در تاسماهیان خالص می‌تواند نشان‌دهنده خالص بودن گونه باشد.

کلیدواژه‌ها: بارکد مولکولی، خاویار، ژن میتوکندریایی، COI، D-loop.

۱- مقدمه

یکی از ارزشمندترین مواد غذایی خاویار است که به تخمک‌های بارور نشده استحصالی از جنس ماده گونه‌های مختلف تاسماهیان (Sturgeons) اطلاق می‌شود. خاویار ایران دهه‌ها به دلیل شرایط اکولوژیکی سواحل جنوبی دریای کاسپین و هم‌چنین رعایت دقیق استانداردهای بهداشتی^۱ GMP و HACCP^۲ در کلیه مراحل صید، عمل‌آوری، جابجایی و حمل‌ونقل، بسته‌بندی و نگهداری از بالاترین کیفیت در سطح جهان برخوردار بوده است.

^۱ Good Manufacturing Practice (GMP)

^۲ Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP)

رعایت استانداردهای رقم‌بندی خاویار بر اساس اندازه، رنگ، سالم بودن دان‌ها و یکپارچگی آن‌ها، توجه و اجرای دقیق مقررات بین‌المللی و به‌طورکلی کیفیت خاویار ایران توجه تجار و توزیع‌کنندگان خاویار در سطح جهان جلب نموده و تقاضای بیشتری در مقایسه با میزان عرضه برای آن وجود داشته است [1].

خاویار یک ماده غذایی لذیذ و پراهمیت می‌باشد که ضریب هضمی و جذبی بالایی دارد و درصد بالایی از پروتئین، اسیدهای آمینه و اسیدهای چرب غیراشباع در آن موجود می‌باشد که ازجمله مواد مغذی موردنیاز بدن انسان برای رشد و ترمیم و مقاومت در برابر بیماری‌ها می‌باشد. سه نوع خاویار بلوگا، آسترا و سوروگا به ترتیب حاصل از تخمک فیل‌ماهی (*Huso huso*)، تاسماهی ایرانی یا روسی (*Acipenser persicus*)، *A. gueldenstadti* و ازون برون (*A. stellatus*) در بازار جهانی به فروش می‌رسد که خاویار بلوگا بهترین کیفیت را از جهت اندازه دان (دان درشت)، رنگ و استحکام دارا می‌باشد. گونه، مرغوبیت و عدم آمیختگی خاویار چندگونه در محصولات تهیه شده از خاویار تاسماهیان از چالش‌های بسیار مهم در تجارت قانونی و بین‌المللی این محصولات می‌باشد.

امروزه، برای جلوگیری از تجارت غیرقانونی خاویار ماهیان وحشی دو مرکز اروپایی (شرکت خصوصی Geneus biotech و مرکز تحقیقاتی IGB آلمان) متولی ردیابی در ماهیان خاویاری می‌باشند. این شرکت‌ها یک الگوی ژنومی منحصربه‌فرد را برای هر ماهی مادر با خاویار آن شناسایی می‌کنند. آزمایش آن‌ها می‌تواند منشاء والدین را تا سطح یک تخمک خاویار شناسایی کند. این شناسه مبتنی بر DNA با فناوری مرسوم فرستنده غیرفعال نسل بعدی (Next-generation passive transponder technology) که بر روی بسته‌بندی محصول اعمال می‌شود، همراه می‌باشد و در نتیجه یک زنجیره‌تامین محصول کاملاً قابل ردیابی، ایجاد می‌شود. از طرفی، در داخل کشور، در بسیاری از رستوران‌ها و مراکزی که مدعی استفاده از گوشت و خاویار تاسماهیان می‌باشند، هم احتمال تقلب و جایگزینی با گوشت دیگری از آبزیان هم وجود دارد. بر اساس اطلاعات مجمع بین‌المللی گونه‌های در معرض خطر انقراض (CITES) تمامی گونه‌های خانواده تاسماهیان جزء گونه‌های حفاظت شده می‌باشند و بسیاری از گونه‌ها در معرض خطر انقراض می‌باشند. برای ردیابی خاویار و محصولات تاسماهیان، ژن‌های DNA موجود در mtDNA به جهت جهش بالاتر برای شناسایی و ردیابی گونه‌ها استفاده می‌شوند [2].

اولین بار بریستن و همکاران [3] با استفاده از توالی یابی ژن‌های میتوکندری و همین‌طور لودویج و همکاران [4] از یکی از ژن‌های میتوکندری (سیتوکروم اکسیداز b) برای ردیابی و تشخیص ماهیان خاویاری استفاده کردند که برای تایید مطالعات آن‌ها نیاز به تعداد بالایی از واکنش زنجیره پلی‌مراز با هضم آنزیمی بود. در سال ۲۰۰۸ تفاوت گونه‌های تاسماهیان توسط میوگ و همکاران [5] با استفاده از چند شکلی ژن D-loop در تاسماهیان مختلف گزارش شد که قابل ردیابی روی ژل آگارز بودند. پاپالاردو و همکاران [6] با استفاده از خاویار تاسماهیان و روش PCR-RFLP اقدام به شناسایی برخی از گونه‌های تاسماهیان کردند. جمشیدی و حسن زاده صابر [7] با استفاده از توالی یابی ناحیه بارکدینگ COI و سیتوکروم b در عصاره و کرم خاویار DNA تاسماهیان را شناسایی و گزارش کردند که آنالیز آن‌ها قادر به شناسایی گونه تاسماهیان در محصولات تهیه شده از آن‌ها می‌باشد.

هدف این تحقیق شناسایی بافت تخمک فرآوری شده تاسماهیان که همان خاویار به آن اطلاق می‌شود، با استفاده از روش‌های مرسوم بارکدینگ مولکولی در سطح ژنوم میتوکندری که نشانگر گونه باشد، می‌باشد که در صورت مثبت بودن، راه دستیابی به اطلاعات گونه جانور با در اختیار گرفتن تنها چند عدد خاویار سهل و آسان خواهد بود.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- استخراج DNA از خاویار و بافت باله تاسماهیان

به منظور استخراج DNA، سه عدد خاویار از ۵ گونه خالص از تاسماهیان دریای کاسپین شامل تاسماهی روسی، تاسماهی ایرانی، شپ و ازون برون، استرلیاد و تاسماهی سیبری خالص با استفاده از نیتروژن مایع به صورت پودر در آمده و استخراج DNA با استفاده از کیت DNeasy tissue (Qiagen, Hilden, Germany) kit با اندکی تغییرات انجام شد. در مرحله انتهایی استخراج DNA، نمونه‌ها در آب مقطر استریل دوبار تقطیر حل شدند. برای نمونه‌های موجود در بازار (۲۱ عدد) نیز پس از باز کردن درب محصول، تعداد ۳ خاویار از هر محصول مورد آزمون قرار گرفت.

هم‌چنین، روش استفاده از کیت کیاژن برای استخراج DNA از بافت باله پنج گونه از تاسماهیان دریای کاسپین و دو گونه استرلیاد و تاسماهی سیبری نیز مورد استفاده قرار گرفت.

۲-۲- ارزیابی کمیت و کیفیت DNA استخراج شده از خاویار و باله تاسماهیان

جهت تعیین کمیت DNA استخراج شده از روش‌های اسپکتروفتومتری (استفاده از نانودراپ ND1000) در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر و نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر، استفاده شد. برای سنجش میزان جذب در ۲۶۰ نانومتر (غلظت DNA) پس از کالیبره کردن دستگاه نانودراپ با بافر رقیق‌کننده مثل آب یا TE، میزان DNA موجود در آن در طول موج ۲۶۰ نانومتر برحسب نانوگرم بر میکروگرم اندازه‌گیری گردید. بررسی کیفیت DNA استخراج شده بافت باله و خاویار تاسماهیان روی ژل آگارز ۱% مورد بررسی قرار گرفت.

۲-۳- انتخاب آغازگر برای تشخیص خاویار تاسماهیان

در تحقیق حاضر از ژن بارکدینگ ناحیه COI ماهیان خاویاری قطعه‌ای کوتاه تکثیر شد که آغازگرهای آن توسط وارانیاک و همکاران [8] طراحی شده است (جدول ۱). این آغازگرها تنها در ماهیان خاویاری قطعه مذکور را تکثیر می‌کنند و برای گونه‌های دیگر مثل سخت‌پوستان و ماهیان استخوانی دیگر عملکردی ندارد. بر اساس تفاوت‌های مولکولی بین DNA میتوکندری ناحیه D-loop گونه‌های تاسماهیان از خاویار تمام تاسماهیان موجود در دریای کاسپین و خاویار تاسماهی استرلیاد (*A. ruthenus*) و تاسماهی سیبری (*A. baerii*) برای شناسایی گونه‌ای استفاده شد و پروفایل ایجاد شده با پروفایل مولکولی ایجاد شده بافت باله همان گونه‌ها روی ژل آگارز بررسی شد که می‌بایست قطعه تکثیر شده گونه‌های مختلف در محل‌های متفاوتی نسبت به هم قرار بگیرند.

آغازگر اختصاصی تاسماهیان با نام *ACOII* برای تکثیر ژن *CoI* از تحقیقات وارانیاک و همکاران [8] انتخاب شد. این جفت آغازگر ناهماهنگی بسیار کمی با دیگر گونه‌های *Acipenseridae* دارند و قادر به تکثیر DNA گونه‌های دیگر ماهیان خاویاری هستند. پنج گونه از تاسماهیان دریای کاسپین، استرلیاد و تاسماهی سیبری برای تکثیر توسط پرایمرهای *CoI* مورد آزمون قرار گرفتند. کنترل منفی شامل DNA ماهی قزل‌آلا (*Oncorhynchus mykiss*) و ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) بود. برنامه حرارتی مورد استفاده برای این قطعه دقیقاً به مانند مطالعه وارانیاک و همکاران [8] شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۵ دقیقه، به دنبال آن ۳۵ سیکل ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه، ۵۶ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه قرار داده شد و در انتها به مدت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت.

۲-۴- انتخاب آغازگر برای تشخیص گونه خاویار تاسماهیان

بر اساس تحقیقات میوگ و همکاران [5]، آغازگرهایی در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفتند که بتوانند اندازه قطعه متفاوتی را تکثیر کنند (جدول ۱). به گونه‌ای که آغازگر راست (Reverse) به‌طور مشترک برای تاسماهیان دریای کاسپین، از منطقه کوچکی که در غالب تاسماهیان حفاظت شده است، انتخاب شد (پرایمر AHR) ولی آغازگرهای چپ (Forward) اختصاصی (Specific) برای هر گونه طراحی شد که فقط قادر است به شکل ویژه، DNA یک گونه خاص تاسماهی را تکثیر کند.

برای هر جفت آغازگر ویژه یک گونه از تاسماهیان دریای کاسپین کار مناسب‌سازی درجه حرارت با استفاده از روش PCR gradient در دستگاه Eppendorf ساخت کشور آلمان صورت پذیرفت و در همان دمای مناسب تمامی نمونه‌ها تکثیر شده و روی ژل آگارز ۲% بررسی شد. برنامه حرارتی به‌دست‌آمده برای این آغازگرها بر اساس تحقیقات میوگ و همکاران [5] با اندکی تغییرات انجام شد.

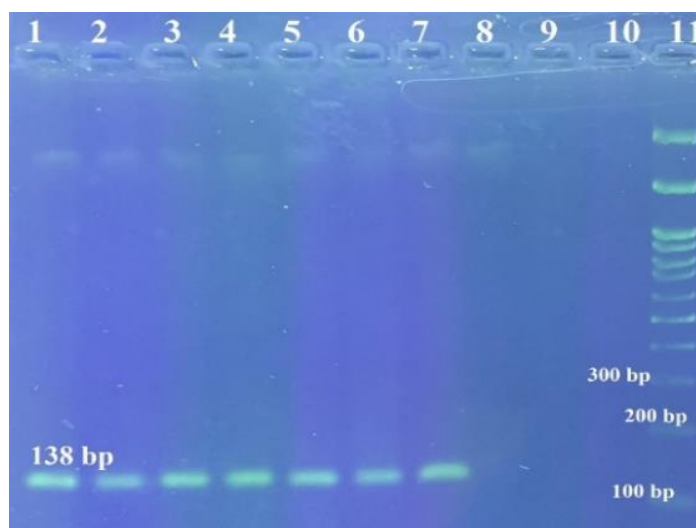
جدول ۱- توالی نوکلئوتیدی مربوط به آغازگرهای مورد استفاده در تشخیص خاویار تاسماهیان.

Table 1- Nucleotide sequence related to the primers used in the detection of sturgeons' caviar.

Primer	Nucleotide Sequence
ACoIIIF	CCATCATAATTG GCG GAT TCGG
ACoIIIR	CCC CAGAGGAGG CTA AAAGG
Waraniak et al. [8]	
HusF	TATCTATTACCTGCGAGCAGGCTG
NudF	TGTCTTTTCTGAAGGAGCTTTGC
SteF	GGGGTTCTTGGCATGTTGTGAGCG
AGF	GCACAGACTATGTGGTATCCAGAA
ABF	CAGATGCCAGTAACAGGCTGA
ABRAM	TGTCTGTCTAGAACATATG
AHR	TATACACCATTATCTCTATGT
Mugue et al. [5]	

۳- نتایج

بر اساس نتایج کمی غلظت DNA با استفاده از نانو دراپ همگی دارای نسبت جذب $260/280$ نانومتر مناسب در دامنه $2-1/8$ بودند و غلظت DNA استخراج شده بین 150 تا 650 نانوگرم در میکرو لیتر بود و DNA از کیفیت مناسبی روی ژل برخوردار بود. در این تحقیق، تکثیر قطعه 138 نوکلئوتیدی مختص تاسماهیان با آغازگر اختصاصی این خانواده روی ژل آگارز نشان داده شده است (شکل‌های ۱ و ۲). این باند برای تمامی گونه‌های تاسماهیان دریای کاسپین و تاسماهی سیبری و استرلیاد باند یک اندازه‌ای را تکثیر کردند. این آغازگر اختصاصی باندی را برای دیگر خانواده‌های بی مهرگان آبی و ماهیان استخوانی تکثیر نمی‌کند [8]. در این تحقیق باندی برای ماهی قزل‌آلا و ماهی کپور به عنوان کنترل منفی تکثیر نشد.

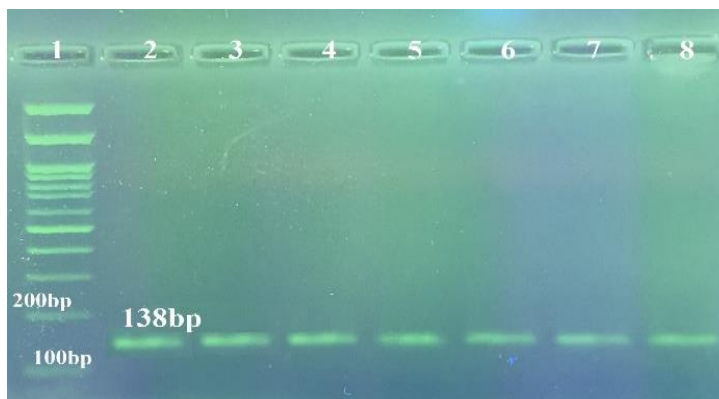


شکل ۱- الکتروفورز ژل آگارز 2.5% از باند تکثیر شده 138 نوکلئوتیدی از تکثیر نمونه DNA باله تمامی گونه‌های تاسماهیان دریای کاسپین، استرلیاد و تاسماهی سیبری؛ ستون ۱: فیل ماهی، ستون ۲: تاسماهی شیپ، ستون ۳: ازون برون، ستون ۴: تاسماهی سیبری، ستون ۵: استرلیاد، ستون ۶ و ۷: تاسماهی روسی و ایرانی، ستون ۸: قزل‌آلا، ستون ۹: کپور، ستون ۱۰: DNA انسانی، ستون ۱۱: 100 bp ladder مربوط به شرکت سینا کلون.

Figure 1- Agarose gel electrophoresis of 2.5% of the amplified band of 138 nucleotides from the amplification of fin DNA samples of all species of Caspian Sea Sturgeons, Sterlet and Siberian sturgeon; Column 1: Beluga, Column 2: Ship sturgeon, Column 3: Sevruga, Column 4: Siberian sturgeon, Column 5: Sterlet, Columns 6 and 7: Russian and Persian sturgeon, Column 8: Trout (*Oncorhynchus mykiss*), Column 9: Carp (*Cyprinus carpio*), Column 10: Human DNA (*Homo sapiens*), Column 11: 100 bp ladder from Sina Clone Corporation.

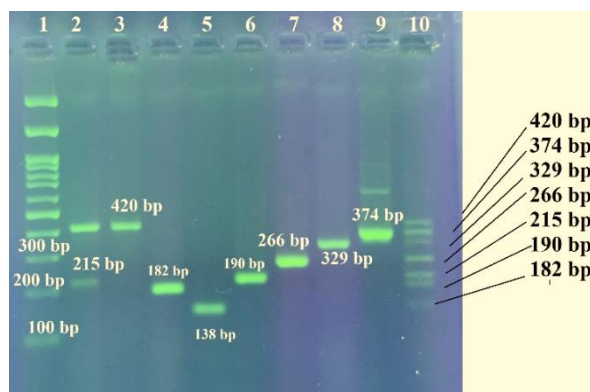
همین‌طور آغازگرهای مربوط به تشخیص گونه‌ای تاسماهیان بر اساس پنل پیشنهادی میوگ و همکاران [5]، باند 374 نوکلئوتیدی در فیل ماهی، باند 329 نوکلئوتیدی در تاسماهی شیپ، باند 266 نوکلئوتیدی در ازون برون، باند 138 و 182 نوکلئوتیدی در تاسماهی سیبری، باند 190 نوکلئوتیدی

در استرلیاد، باند ۴۲۰ نوکلئوتیدی در تاسماهی روسی و پروفایل ۴۲۰ نوکلئوتیدی و ۲۱۵ نوکلئوتیدی در تاسماهی روسی-شبه سیری تکثیر کردند (شکل‌های ۳ و ۴) که نشان‌دهنده گونه تاسماهی می‌باشد که خاویار از آن گرفته شده است.



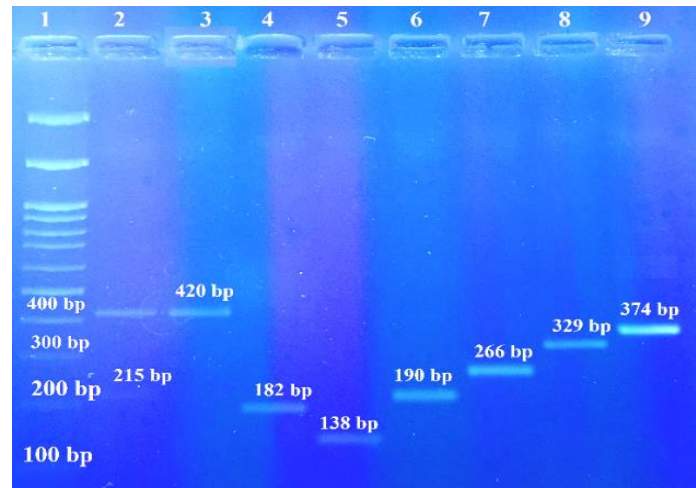
شکل ۲- الکتروفورز ژل آگارز ۲/۵٪ از باند تکثیر شده ۱۳۸ نوکلئوتیدی از تکثیر نمونه DNA خاویار تمامی گونه‌های تاسماهیان دریای کاسپین، استرلیاد و تاسماهی سبیری؛ ستون ۱: 100 bp ladder مربوط به شرکت سیناکلون، ستون ۲: تاسماهی شیپ، ستون ۳: ازون برون، ستون ۴: تاسماهی سبیری، ستون ۵: استرلیاد، ستون‌های ۶ و ۷: تاسماهی روسی و ایرانی، ستون ۸: فیل‌ماهی.

Figure 2- Agarose gel electrophoresis of 2.5% of the amplified band of 138 nucleotides from the amplification of caviar DNA samples of all species of Caspian Sea sturgeons, Sterlet and Siberian sturgeon; Column 1: Beluga, Column 2: Ship sturgeon, Column 3: Sevruga, Column 4: Siberian sturgeon, Column 5: Sterlet, Columns 6 and 7: Russian and Persian sturgeon, Column 8: 100 bp ladder related to Sina clone corporation.



شکل ۳- الکتروفورز ژل آگارز ۲٪ برای نشان دادن باند اختصاصی گونه‌های مختلف تاسماهیان دریای کاسپین، استرلیاد و تاسماهی سبیری حاصل از تکثیر آغازگرهای اختصاصی هرگونه به روی DNA استخراج شده بافت باله؛ ستون ۱: 100 bp ladder مربوط به شرکت سیناکلون، ستون ۲: تاسماهی روسی میتو تایپ شبه سبیری قطعات ۴۲۰ و ۲۱۵ نوکلئوتیدی (آغازگرهای AGF, ABF, ABRAM, AHA)، ستون ۳: تاسماهی روسی قطعه ۴۲۰ نوکلئوتیدی (آغازگرهای AGF, ABF, ABRAM, AHA)، ستون ۴: تاسماهی سبیری قطعه ۱۸۲ نوکلئوتیدی (آغازگرهای ABF, AHR)، ستون ۵: تاسماهی سبیری قطعه ۱۳۸ نوکلئوتیدی (آغازگرهای ABF, ABRAM)، ستون ۶: استرلیاد قطعه ۱۹۰ نوکلئوتیدی (آغازگرهای RutF, AHR)، ستون ۷: ازون برون قطعه ۲۶۶ نوکلئوتیدی (آغازگرهای SteF, AHR)، ستون ۸: تاسماهی شیپ (آغازگرهای NudF, AHR)، ستون ۹: فیل‌ماهی، ستون ۱۰: نشانگر وزن مولکولی محصولات PCR ماهیان خاویاری (مخلوط شده باهم).

Figure 3- 2% agarose gel electrophoresis to show the specific band of different species of Caspian Sea sturgeons, Sterlet and Siberian sturgeon resulting from the amplification of specific primers of each species on the DNA extracted from the fin tissue. Column 1: 100 bp ladder related to Sina clone cooperation; Column 2: Russian sturgeon pseudo-Siberian mitotype fragments 420 and 215 nucleotides (primers AGF, ABF, ABRAM, AHA), column 3: Russian sturgeon 420 nucleotide fragment (primers AGF, ABF, ABRAM, AHA), column 4: Siberian sturgeon fragment 182 Nucleotide (ABF, AHR primers), column 5: Siberian sturgeon, 138 nucleotide fragment (ABRAM, ABRAM primers), column 6: Sterlet, 190 nucleotide fragment (RutF, AHR primers), column 7: Sevruga, 266 nucleotide fragment (SteF, AHR primers), column 8: Ship sturgeon (NudF, AHR primers), column 9: Beluga, column 10: molecular weight indicator of sturgeon PCR products (mixed).



شکل ۴- الکتروفورز ژل آگارز ۲٪ برای نشان دادن باند اختصاصی گونه‌های مختلف تاسماهیان دریای کاسپین، استرلیاد و تاسماهی سبیری حاصل از تکثیر آغازگرهای اختصاصی هرگونه به روی DNA استخراج شده خاویار؛ ستون ۱: 100 bp ladder مربوط به شرکت سینا کلون، ستون ۲: تاسماهی روسی میتو تایپ شبه سبیری قطعات ۴۲۰ و ۲۱۵ نوکلئوتیدی (آغازگرهای AGF, ABF, ABRAM, AHA)، ستون ۳: تاسماهی روسی قطعه ۴۲۰ نوکلئوتیدی (آغازگرهای AGF, ABF, ABRAM, AHA)، ستون ۴: تاسماهی سبیری قطعه ۱۸۲ نوکلئوتیدی (آغازگرهای ABF, AHR)، ستون ۵: تاسماهی سبیری قطعه ۱۳۸ نوکلئوتیدی (آغازگرهای ABF, ABRAM)، ستون ۶: استرلیاد قطعه ۱۹۰ نوکلئوتیدی (آغازگرهای RutF, AHR)، ستون ۷: ازون برون قطعه ۲۶۶ نوکلئوتیدی (آغازگرهای SteF, AHR)، ستون ۸: تاسماهی شیپ (آغازگرهای NudF, AHR)، ستون ۹: فیل ماهی.

Figure 4- 2% agarose gel electrophoresis to show the specific band of different species of Caspian Sea, Sterlet and Siberian sturgeon resulting from the amplification of the specific primers of each species on the extracted caviar DNA; Column 1: 100 bp ladder related to Sina clone corporation, Column 2: Russian sturgeon pseudo-Siberian mitotype fragments 420 and 215 nucleotides (primers AGF, ABF, ABRAM, AHA), Column 3: Russian sturgeon 420 nucleotide fragment (primers AGF, ABF, ABRAM, AHA), Column 4: Siberian sturgeon fragment 182 Nucleotide (ABF, AHR primers), Column 5: Siberian sturgeon, 138 nucleotide fragment (ABRAM, ABRAM primers), Column 6: Sterlet, 190 nucleotide fragment (RutF, AHR primers), Column 7: Sevruga, 266 nucleotide fragment (SteF, AHR primers), Column 8: Ship sturgeon (primers NudF, AHR), Column 9: Beluga.

۴- بحث

هدف از این تحقیق، بررسی نشانگر تشخیص خاویار تاسماهیان (نشانگر عمومی) و بررسی نشانگر تشخیص گونه خاویار (نشانگر تشخیص گونه) بود و به همین جهت از نمونه‌های خالص بافت باله تاسماهیان و خاویار آن‌ها استفاده شد و هیچ نمونه هیبریدی استفاده نشد. قطعه کوتاهی که آغازگر ژن میتوکندریایی *COI* در این تحقیق، تکثیر کرده است، باند اختصاصی تاسماهیان می‌باشد که اولین بار توسط وارانیاک و همکاران [8] برای تشخیص و جداسازی محتویات غذای مصرف شده شکارچیان لارو تاسماهی دریایچه‌ای (*A. fulvescens*) در ایالت میشیگان امریکا طراحی و مورد استفاده قرار دادند. در تحقیق حاضر نیز، برای کنترل منفی‌های استفاده شده (DNA قزل‌آلا و ماهی کپور معمولی) هیچ باندهایی تکثیر نشد، ولی برای تمامی تاسماهیان دریای کاسپین و تاسماهی سبیری و استرلیاد باند مورد نظر، تکثیر شد. این آغازگرها به همراه DNA استخراج شده از تنها سه عدد خاویار توانست قطعه‌ای مختص به تاسماهیان را تکثیر کند (قطعه ۱۳۸ نوکلئوتیدی) که نشان‌دهنده خاویار تاسماهیان می‌باشد که به‌عنوان نشانگر مولکولی عمومی برای ردیابی و تشخیص خاویار تاسماهیان می‌تواند مورد استفاده واقع شود. بارکدینگ DNA به‌طور گسترده‌ای برای تعیین گونه‌ها استفاده می‌شود، زیرا واگرایی توالی معمولاً در بین افراد یک گونه خاص بسیار کمتر از گونه‌های نزدیک به هم است [9]–[12]. سیستم بارکدینگ مولکولی به‌صورت روش مستند برای ارزیابی خاویار به‌منظور صحت‌گذاری و ارزش‌گذاری محصولات خاویار و گوشت تاسماهیان توسط محققین بسیاری برای سال‌های زیادی می‌باشد که مورد استفاده واقع شده است [13]. دلیما و همکاران [14] با استفاده از روش بارکدینگ مولکولی، حدود ۲۵ گونه را که متعلق به ۱۱ خانواده و راسته بودند، با استفاده از تخمک‌های ریخته شده ماهی‌ها در رودخانه پاراناپانما شناسایی کردند. تحقیقات آن‌ها نیز نشان داد که برخی از گونه‌های در معرض خطر انقراض در این رودخانه‌ها تخم‌ریزی می‌کنند. هان و همکاران [15] با استفاده از

بارکدینگ مولکولی ژن سیتوکروم اکسیداز I اقدام به ردیابی برچسب‌گذاری اشتباه^۱ در محصولات غذایی حاوی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) و ماهی آزاد اقیانوس اطلس (*Salmo salar*) در فروشگاه‌های آنلاین و سوشی بارهای چین انجام دادند و به این نتیجه رسیدند که این میزان تفاوت در برچسب‌گذاری اشتباه ممکن است تا به میزان ۵۰٪ هم برسد. دسال و بریستن [16] در سال ۱۹۹۶ با تکنیک بررسی ژن‌های میتوکندری توانستند خاویار سیاه گونه‌های ماهیان خاویاری را از هم تشخیص دهند. محققى به نام لودویج و همکاران [4] با استفاده از بررسی ژن سیتوکروم *b* و تکنیک برش آنزیمی، با استفاده از ۷ آنزیم برشی موفق به شناسایی هفده گونه از راسته تاسماهی شکلان شدند؛ اما شناسایی گونه‌های جنس *Scaphirhynchus* و همین‌طور تفاوت دو گونه تاسماهی ایرانی و روسی با استفاده از روش آن‌ها امکان‌پذیر نشد. رضوانی گیلک‌لایی [17] با استفاده از تکنیک^۲ SCAR موفق شدند خاویار گونه تاسماهی شیب، آسترا (خاویار تاسماهی روسی و ایرانی) را از خاویار بقیه گونه‌های تاسماهیان ایران تشخیص دهند. محققى به نام فوت-بیات [18] توانست با بررسی دو لوکوس *Afu-68* و *Afu-39* میکروستاتیت که هر کدام دارای ال‌های متفاوتی در گونه‌های ماهیان خاویاری بودند، خاویار گونه‌های متفاوت تاسماهیان را از هم تشخیص دهد. غدیرزاد و همکاران [19] با استفاده از ناحیه بارکدینگ *COI* تعداد ۳ گونه از ۵ گونه تاسماهیان دریای کاسپین را به‌درستی از هم تفکیک کردند؛ اما تشخیص نهایی با بررسی توالی‌یابی امکان‌پذیر بود که تاسماهیان دریای کاسپین از این طریق شناسایی شدند ولی تشخیص دو گونه تاسماهی روسی و ایرانی با توالی‌یابی از هم امکان‌پذیر نبود. هم‌چنین تعدادی از نمونه‌های تاسماهی ایرانی هیچ باندی را تکثیر نکردند که این نتایج عدم تکثیر باند با استفاده از آغازگرهای اختصاصی تاسماهی روسی، در مطالعه میوگ و همکاران [5] هم دیده شده است. در پنل تشخیص گونه تاسماهیان با استفاده از تکثیر قطعه‌ای از ژن D-loop که در تحقیق حاضر نیز به کار برده شده، هرگونه از تاسماهیان اندازه قطعه‌ای مختص به خود روی ژل آگارز ایجاد می‌کنند که به‌راحتی در عرض چند ساعت قابل انجام می‌باشد و نیاز به توالی‌یابی ندارد. کلنگی میاندره و همکاران [20] با استفاده از توالی‌یابی ژن سیتوکروم *b* اقدام به شناسایی خاویار سه گونه فیل ماهی، شیب و اوزن‌برون کردند. پوپا و همکاران [21] با استفاده از تکنیک qPCR توانستند محصولات بازاری ماهیان خاویاری را با مقدار بسیار جزیی DNA در محصول مورد شناسایی قرار دهند. تحقیقی توسط پاپالاردو و همکاران [6]، برای شناسایی گونه تاسماهیان از روی آنالیز مولکولی خاویار انجام شد و با استفاده از هضم آنزیمی قطعه تکثیرشده در روش زنجیره پلی مرز با آنزیم‌های برشی متفاوت، تنها یک هضم آنزیمی، الگوی متفاوتی برای تشخیص گونه‌های تاسماهیان و همین‌طور خاویار تقلبی را نشان دادند که در نتیجه ردیابی خاویار اصل از تقلبی در مدت‌زمان هفت ساعت قابل انجام می‌باشد. ژانگ و همکاران [13] با آنالیز مولکولی محصولات خاویار نشان دادند که همه محصولات به‌عنوان گونه ماهیان خاویاری تایید شده است. باین حال، ۴۲/۵٪ از محصولات به‌طور کامل با اطلاعات برچسب مطابقت نداشتند. نتایج مطالعه آن‌ها شکاف بین حقیقت اعلام شده روی محصولات و لزوم استفاده از برچسب CITES مبنی بر اطمینان از تجارت عادلانه و پایداری محصولات را تایید کرد. دودو و همکاران [22] نشانگرهای به کار برده شده میتوکندری را برای شناسایی فیل ماهی و ماهی شیب بر اساس پنل تاسماهیان و بر اساس تحقیق میوگ و همکاران [5] تایید کردند. در این تحقیق نیز تشخیص گونه تاسماهی با استفاده از به کارگیری پنل ذکر شده و اندازه باندهای متفاوت ایجاد شده قابل ارزیابی بود که این ردیابی و تشخیص گونه هم برای نمونه‌های بافت تاسماهیان و هم نمونه خاویار آن‌ها قابل انجام بود. این روش که مبتنی بر بررسی محتوی ژنوم میتوکندریایی می‌باشد، در جهت تشخیص سریع و کارآمد ارزش بالایی دارد؛ اما می‌بایست توجه شود که اساس این روش بر ارزیابی ژنوم مادری می‌باشد و امروزه به جهت هیبریداسیون‌های هدف‌دار برخی گونه‌ها برای پرورش گونه‌های زود بازده و تولید گوشت، امکان ردیابی نسل هیبرید زایایی که تولید تخمک می‌کنند و تشخیص خاویار هیبرید تنها از طریق بررسی ژنوم مادری غیرممکن می‌باشد. برای ردیابی محصولات خاویار هم داخل و هم بحث صادرات محصولات خاویار، مثل ردیابی تقلب (Fraud detection) و جلوگیری از برحسب زدن اشتباه (Mislabeling) نیاز به سیستم جامع برای حفظ کیفیت محصول و جلوگیری از صید غیرقانونی و تقلب می‌باشد و در ردیابی اطلاعات هر محصول، سیستم بارکدها خصوصاً بارکدهای مولکولی یکی از ابزارهای قدرتمند می‌باشد. علی‌رغم این‌که برچسب کنوانسیون CITES برای تجارت خاویار ضروری نیست و کشورهایی مثل چین، روسیه و ژاپن قوانین مختص به خود برای تجارت خاویار دارند؛ اما ضروری می‌باشد برای نزدیک شدن به استانداردهای کشورهای اروپایی تجارت خاویار بر اساس قوانین سایتس، اقدام به شناسایی و بارکدینگ محصولات خاویار با ابزارهای قدرتمندی مثل بارکدینگ مولکولی و ردیابی نشانگرها شود.

¹ Mislabeling² Sequence Characterized Amplified Region (SCAR)

۵- نتیجه‌گیری

این روش شناسایی مولکولی که برای پاسخ به وجود DNA تاسماهیان می‌باشد، بررسی قابلیت تفکیکی بر اساس تشکیل باند روی ژل دارد و مسلماً می‌تواند برای تشخیص گونه خاویار تمامی تاسماهیان دریای کاسپین بر اساس تفاوت اندازه ایجاد شده روی ژل آگارز مورد استفاده واقع شود که از نظر وقت و هزینه، مقرون به صرفه می‌باشد و در تحقیقات تکمیلی تشخیص گونه و هیبریدها می‌تواند به عنوان ابزار کمکی موثر واقع شود.

سپاس‌گزاری

نویسندگان مراتب سپاسگزاری خود از انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری به جهت فراهم‌آوری امکانات انجام این تحقیق اعلام می‌دارد.

تعارض منافع

بدین وسیله اعلام می‌دارد که هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

منابع

- [1] Moradi, Y. (2007). *Caviar control and processing*. Agricultural Education and Extension Institute. (In Persian). <https://www.gisoom.com/book/1571307/>
- [2] Tang, Q., Liu, H., Mayden, R., & Xiong, B. (2006). Comparison of evolutionary rates in the mitochondrial DNA cytochrome b gene and control region and their implications for phylogeny of the Cobitoidea (Teleostei: Cypriniformes). *Molecular phylogenetics and evolution*, 39(2), 347–357. DOI:10.1016/j.ympev.2005.08.007
- [3] Birstein, V. J., Hanner, R., & Desalle, R. (1997). Phylogeny of the acipenseriformes: cytogenetic and molecular approaches. In *Developments in environmental biology of fishes* (pp. 127–155). Kluwer Academic Publishers.
- [4] Ludwig, A., Debus, L., & Jenneckens, I. (2002). A molecular approach to control the international trade in black caviar. *International review of hydrobiology*, 87(5–6), 661–674. DOI:10.1002/1522-2632(200211)87:5/6<661::AID-IROH661>3.0.CO;2-S
- [5] Miuge, N. S., Barmintseva, A. E., Rastorguev, S. M., Miuge, V. N., & Barmintsev, V. A. (2008). Polymorphism of the mitochondrial DNA control region in eight sturgeon species and development of a system for DNA-based species identification. *Genetika*, 44(7), 913–919.
- [6] Pappalardo, A. M., Petraccioli, A., Capriglione, T., & Ferrito, V. (2019). From fish eggs to fish name: Caviar species discrimination by Coibar-RFLP, an efficient molecular approach to detect fraud in the caviar trade. *Molecules*, 24(13), 2468. DOI:10.3390/molecules24132468
- [7] Jamshidi, S., & Hasanzadeh Saber, M. (2021). Investigating verification of sturgeon caviar in cosmetic products using barcoding method of mitochondrial genes. *Journal of aquatic physiology and biotechnology*, 9(2), 1–20. (In Persian). https://japb.guilan.ac.ir/article_5020_en.html
- [8] Waraniak, J. M., Blumstein, D. M., & Scribner, K. T. (2018). Barcoding PCR primers detect larval lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*) in diets of piscine predators. *Conservation genetics resources*, 10(2), 259–268. DOI:10.1007/s12686-017-0790-5
- [9] Hebert, P. D. N., Stoeckle, M. Y., Zemlak, T. S., & Francis, C. M. (2004). Identification of birds through DNA barcodes. *Plos biology*, 2(10), e312. DOI:10.1371/journal.pbio.0020312
- [10] Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., & Dewaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the royal society b: biological sciences*, 270(1512), 313–321. DOI:10.1098/rspb.2002.2218
- [11] Ward, R. D., Zemlak, T. S., Innes, B. H., Last, P. R., & Hebert, P. D. N. (2005). DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical transactions of the royal society B: biological sciences*, 360(1462), 1847–1857. DOI:10.1098/rstb.2005.1716
- [12] Costa, F. O., DeWaard, J. R., Boutillier, J., Ratnasingham, S., Dooh, R. T., Hajibabaei, M., & Hebert, P. D. N. (2007). Biological identifications through DNA barcodes: The case of the Crustacea. *Canadian journal of fisheries and aquatic sciences*, 64(2), 272–295. DOI:10.1139/F07-008
- [13] Zhang, X., Tinacci, L., Xie, S., Wang, J., Ying, X., Wen, J., & Armani, A. (2022). Caviar products sold on Chinese Business to customer (B2C) online platforms: Labelling assessment supported by molecular identification. *Food control*, 131, 108370. DOI:10.1016/j.foodcont.2021.108370
- [14] De Lima, M. C. C., Lima, S. C., Savada, C. S., Suzuki, K. M., Orsi, M. L., & de Almeida, F. S. (2020). Use of DNA barcode in the identification of fish eggs in tributaries of the paranapanema river basin. *Genetics and molecular biology*, 43(3), 1–9. DOI:10.1590/1678-4685-gmb-2019-0352
- [15] Han, C., Dong, S., Li, L., Gao, Q., & Zhou, Y. (2021). DNA barcoding and mini-DNA barcoding reveal mislabeling of salmonids in different distribution channels in the Qingdao area. *Journal of ocean university of China*, 20(6), 1537–1544. DOI:10.1007/s11802-021-4777-1

- [16] DeSalle, R., & Birstein, V. J. (1996). PCR identification of black caviar. *Nature*, 381(6579), 197–198. DOI:10.1038/381197a0
- [17] Rezaei Gilkolaei, S. (2002). DNA PCR amplification for species diagnosis of caviar from Caspian Sea sturgeon. *Journal of agricultural science and technology*, 4, 51–61.
- [18] Fopp-Bayat, D. (2007). Genetic identification of black caviar based on microsatellite DNA analysis. *Environmental biotechnology*, 3(2), 57–60.
- [19] Ghadirnejad, H. (2009). Barcoding of five sturgeon species in Iran. *Journal of molecular genetics I*, 2(4), 29–34.
- [20] Kolangi Miandare, H., Farahmand, H., Aghilinejad, S. M., & Akbarzadeh, A. (2012). Introduction of Cyt b gene as useful gene for identification of Caspian Sturgeon caviar. *Utilization and cultivation of aquatics*, 1, 51-62. (In Persian). https://japu.gau.ac.ir/article_1170.html?lang=en
- [21] Popa, G. O., Dudu, A., Bănăduc, D., Curtean-Bănăduc, A., Barbălată, T., Burcea, A., ... & Costache, M. (2017). Use of DNA barcoding in the assignment of commercially valuable fish species from Romania. *Aquatic living resources*, 30, 20. DOI:10.1051/alr/2017018
- [22] Dudu, A., Samu, M., Maoreanu, M., & Georgescu, S. E. (2022). A multistep DNA-based methodology for accurate authentication of sturgeon species. *Foods*, 11(7), 1007. DOI:10.3390/foods11071007



Paper Type: Original Article



The Effects of Climate Change on the Distribution Pattern and Habitat Suitability of the Azerbaijan Lizard *Darevskia Raddei Raddei* (Boettger, 1892) (Lizards: *Lacertidae*)

Rasoul Karamiani^{1,*}, Amir Dehghani²

¹Department of Biology, Faculty of Science, Razi University, Kermanshah, Iran r.karamiani@razi.ac.ir; Assistant Professor, karamiani@razi.ac.ir.

²Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Madani University of Azerbaijan, Tabriz, Iran; Assistant Professor: a.dehghani93@gmail.com.

Citation:

Karamiani, R., Dehghani, A. (2023). The effects of climate change on the distribution pattern and habitat suitability of the Azerbaijan lizard *Darevskia raddei raddei* (Boettger, 1892) (Lizards: *Lacertidae*). *The quarterly scientific journal of applied biology*, 36(3), 95-103.

Received: 03/01/2023

Accepted: 17/09/2023

Abstract

Introduction: The awareness of the distribution of species is very important in their conservation. Of 35 species lizards of the genus *Darevskia* Arribas, 1997 (*Lacertidae*), ten species are documented from Iran. The Azerbaijan lizard *D. raddei* (Boettger, 1892) include three recognized subspecies *D. raddei chaldoranensis*, *D. raddei vanensis* and *D. raddei raddei*, *Darevskia raddei raddei* is distributed in Ardabil, East Azerbaijan and West Azerbaijan Provinces.

Methods: In the study, used the maximum entropy approach based on climatic variables, modeled the potential distribution areas and determined the suitable habitats in the Last Interglacial (LIG), and Mid-Holocene (MH), the contemporary as well as predicated distribution in the future (2080) under the representative concentration pathway scenarios (RCP 2.6 and RCP 8.5) of greenhouse gas concentration levels for the subspecies.

Results: Precipitation of the warmest quarter of the year, mean temperature of the coldest quarter of the year and seasonal temperature were the most important factors in simulated the distribution pattern of the subspecies in the LIG and MH respectively. Mean temperature of the coldest quarter of the year, seasonal temperature, and isothermality variables constructed important contributions to the contemporary distribution it. Precipitation of the warmest quarter of the year, precipitation of the coldest quarter of the year and isothermality were the most important factors affecting species distribution for the future.

Conclusion: It seems over time, climatic change has been responsible for destruction of habitats the subspecies, although human activity in the fragmentation, destruction and change of habitats cannot be ignored.

Keywords: Distribution, Azerbaijan lizard, Weather conditions.



Corresponding Author: karamiani@razi.ac.ir



<https://doi.org/10.22051/jab.2023.42488.1537>



اثرات تغییر اقلیم بر الگوی پراکنش و مطلوبیت زیستگاه سوسمار آذربایجانی *Darevskia raddei raddei* (Boettger, 1892) (سوسماران: لاسرتیده)

رسول کریمانی^۱، امیر دهقانی^۲

^۱ استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران.

^۲ استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران.

چکیده

مقدمه: آگاهی از پراکندگی و استقرار گونه‌ها امری بدیهی و بسیار مهم در حفاظت از آن‌ها است. از ۳۵ گونه‌ی سوسمار جنس *Darevskia* Arribas, 1997 (خانواده لاسرتیده) ده گونه در ایران پراکنده شده است. گونه *D. raddei* (Boettger, 1892) دارای سه زیر گونه *D. raddei chaldoranensis*، *D. raddei raddei* و *D. raddei vanensis* است. *Darevskia raddei raddei* در استان‌های اردبیل، آذربایجان شرقی و آذربایجان غربی پراکنش یافته است.

روش‌ها: در این مطالعه با استفاده از رویکرد بی‌نظمی بیشینه براساس متغیرهای اقلیمی، پتانسیل پراکنش، تعیین زیستگاه‌های مناسب و پیش‌بینی آن‌ها از آخرین بین یخبندان، دوره هولوسن-میانی، عصر حاضر و آینده (سال ۲۰۸۰) تحت سناریوهای نماینده خط سیر غلظت گازهای گلخانه‌ای (RCP 2.6 و RCP 8.5) برای سوسمار آذربایجانی *D. raddei raddei* ارزیابی گردید.

یافته‌ها: بارش گرم‌ترین سه ماه سال، میانگین دمای سردترین سه ماه سال و دمای فصلی مهم‌ترین عوامل در شبیه‌سازی الگوی پراکنش *D. raddei raddei* در آخرین بین یخبندان و دوره هولوسن-میانی بودند. میانگین دمای سردترین سه ماه سال، دمای فصلی، هم‌دمایی مهم‌ترین عوامل شکل‌دهنده پراکنش آن در دوره معاصر بودند. برای آینده بارش گرم‌ترین سه ماه سال، بارش در سردترین سه ماه سال و هم‌دمایی مهم‌ترین عوامل شکل‌دهنده پراکنش گونه بودند.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد با گذشت زمان، تغییرات اقلیمی عامل تخریب زیستگاه *D. raddei raddei* بوده است، اگرچه نمی‌توان فعالیت‌های انسانی در تکه‌تکه شدن، تخریب و تغییر زیستگاه‌ها را نادیده گرفت.

کلیدواژه‌ها: پراکنش، سوسمار آذربایجانی، شرایط آب‌وهوا.

۱- مقدمه

تغییرات اقلیم نقشی اساسی در پراکندگی گونه‌های جانوری، مخصوصاً خزندگان ایفا کرده است، یکی از واکنش‌های راهبردی گونه‌ها به تغییرات پایدار آب‌وهوا، تغییر دامنه‌ها به مناطقی که دارای آب‌وهوای مناسب در محدوده تحمل آن‌ها است می‌باشد [1]. تجزیه و تحلیل الگوی پراکنش گونه‌ها قادر است کمک شایانی به درک تحقیقات نظری، تاثیر تغییرات آب‌وهوایی بر توزیع و فراوانی گونه‌ها و فرآیندهای محیط‌زیستی در برنامه‌ریزی حفاظت از گونه‌ها کند [2]-[4]. از الگوهای پراکنش گونه می‌توان برای بررسی تاثیر تغییرات آب و هوایی بر توزیع و فراوانی گونه‌ها، تعیین تنوع زیستی، پیش‌بینی توزیع پتانسیل، مناسب بودن زیستگاه برای گونه‌ها و ارزیابی تغییرات احتمالی آینده در تنوع استفاده کرد [3]، [5]-[7]. رویکرد

بیشینه بی‌نظمی (Maximum Entropy) یک رویکرد کلی برای توصیف پراکنش احتمالی از گزارش‌های اندک حضور گونه‌ها است [8]. توزیع احتمالی براساس متغیرهای محیطی موثر بر منطقه مورد مطالعه تخمین زده می‌شود [9]. اقلیم عصرهای گذشته و حاضر را می‌توان براساس مدل‌های گردش عمومی جو که فرآیندهای فیزیکی جو را به صورت مدل‌های عددی نشان می‌دهند شبیه‌سازی نمود و هم‌چنین شرایط آب‌وهوایی آینده را، تحت سناریوهایی با عنوان نماینده خط سیر غلظت گازهای گلخانه‌ای (RCP) تصویرسازی کرد [10]–[12]. معمولاً برای بررسی خود همبستگی فضایی نقاط گزارش شده حضورگونه‌ها در مناطق از روش موران جهانی^۱ تحت عنوان نمره استاندارد (z-score) استفاده می‌شود. در شاخص موران فرضیه صفر این است که هیچ نوع خوشه‌بندی فضایی بین نقاط استقرار وجود ندارد، حال زمانی که مقدار p-value بسیار کوچک و مقدار Z محاسبه شده بسیار بزرگ باشد آنگاه می‌توان فرضیه صفر را رد کرد. مقدار شاخص I بین -۱ و +۱ متغیر است. هرچه مقدار این شاخص به +۱ نزدیک‌تر باشد نشان از خود همبستگی مکانی بیش‌تر و هرچه به -۱ نزدیک‌تر شود نشان از عدم خودهمبستگی مکانی است؛ در صورتی که مقدار این شاخص صفر باشد دلیلی بر توزیع تصادفی داده‌ها بوده است در واقع هیچ ارتباط مکانی وجود ندارد [13].

در برخی از سوسماران مانند اسکینک‌های چشم ماری *A. panonicus*، *Ablepharus Grayanus* و گونه‌های *Darevskia kopetdaghica* و *Eremias pleskei* و *Phrynocephalus horvathi* توزیع و مطلوبیت زیستگاه‌ها با تغییر اقلیم روند کاهشی [7]، [14] یا افزایشی مانند *Saara loricata* [15] و در برخی دیگر دامنه پراکنش به سمت مناطق خنک شمالی جهان تغییر یافته است [16]. جنس *Darevskia Arribas*, 1997 (سوسماران کوچک خانواده لاسرتیده) دارای ۳۵ گونه در منطقه قفقاز، کریمه و شمال و شرق ترکیه، از شرق کوه‌های البرز تا کپه داغ در مرز ایران و ترکمنستان است [17]، [18]. ده گونه از جنس *Darevskia* در استان‌های آذربایجان غربی، آذربایجان شرقی، اردبیل، گیلان، مازندران، تهران، البرز، گلستان و خراسان شمالی در ایران پراکنده شده است؛ گونه *D. raddei* (Boettger, 1892) با سه زیر گونه *D. raddei chaldoranensis*، *D. raddei D.* و *raddei raddei* منحصراً در استان‌های اردبیل، آذربایجان شرقی و آذربایجان غربی پراکنش یافته است [19]. در این مطالعه به شناسایی مناطق بالقوه پراکنش و درک الگوهای تغییر جغرافیای زیستی سوسمار آذربایجانی *Darevskia raddei raddei*، بر پایه تغییر اقلیم، در سه دوره زمانی از گذشته (آخرین بین یخبندان و دوره هولوسن-میانی)، عصر حاضر و تا آینده (سال ۲۰۸۰) پرداخته خواهد شد.

۲- مواد و روش‌ها

ثبت نقاط حضور در مناطق استقرار گونه براساس فعالیت‌های میدانی شکل ۱ و استفاده از گزارش‌های ثبت شده قبلی از دامنه پراکنش سوسمار آذربایجانی در ایران (استان‌های اردبیل، آذربایجان شرقی و آذربایجان غربی)، ارمنستان، آذربایجان، گرجستان انجام گرفت. در این مطالعه از ۷۶ نقطه حضور گونه استفاده شد [20]–[23]. نتایج شاخص موران برای سوسمار آذربایجانی نشان داد، نقاط نوعی خوشه‌بندی فضایی و الگوی متراکم و نزدیک به هم داشتند. برای بررسی شاخص جهانی موران از نرم‌افزار ArcGIS 10.8 استفاده شد. برای مدل سازی از رویکرد حداکثر آنتروپی (Maximum Entropy: MaxEnt) بر اساس ۱۹ متغیر اقلیمی (Bioclimatic) (جدول الف-۱) برای دوره‌های گذشته (آخرین بین یخبندان: حدود ۱۲۰ هزار سال قبل و دوره هولوسن-میانی: حدود شش هزار سال قبل)، معاصر و آینده (سال ۲۰۸۰) مورد استفاده قرار گرفت. در این تحقیق از بررسی‌های هیات بین دول تغییر اقلیم^۲ در گزارش پنجم^۳ و مدل سیستم اقلیمی مرکز آب‌وهوایی پکن نسخه ۴/۱ استفاده شد (<http://www.ccafs-climate.org>). برای سال ۲۰۸۰ دو سناریو بررسی شد ۱- سناریو RCP 2.6، طبق این سناریو غلظت گازهای گلخانه‌ای در سال ۲۰۳۰ بسیار کم می‌شود و برای غلظت گازهای گلخانه‌ای یک "اوج و نزول" در نظر گرفته شده است، سطح اجباری تابشی گازهای گلخانه‌ای ابتدا تا اواسط قرن حاضر (سال ۲۰۵۰) حدود ۳/۱ وات در هر متر مربع (W/m^2) می‌رسد و سال ۲۱۰۰ به ۲/۶ وات در هر متر مربع باز می‌گردد [24]، برای رسیدن به چنین سطح اجباری از تابش، باید با مدیریت انتشار گازهای گلخانه‌ای و به‌طور غیر مستقیم انتشار آلاینده‌های هوا در گذر زمان غلظت آن‌ها را به میزان قابل توجهی کاهش داد و ۲- سناریو RCP 8.5، براساس این ایده غلظت گازهای گلخانه‌ای با گذشت زمان هم‌چنان بالا خواهد رفت [25].

برای شناسایی نسبت همبستگی بین متغیرها و نقاط ثبت شده حضور گونه، از نرم‌افزار Openmodeller (V. 1.0.7) [26] استفاده شد؛ سپس مقادیر ضریب همبستگی پیرسون در نرم‌افزار SPSS (نسخه ۲۲) مشخص گردید و متغیرهای که دارای ضریب همبستگی پیرسون بیش‌تر از ۰/۷۵ داشتند

¹ Global Moran's I

² Intergovernmental Panel On Climate Change (IPCC)

³ Fifth Assessment Report (AR5)

⁴ The Beijing Climate Center Climate System Model Version 1.1 (BCC-CSM1-1)

حذف شدند [27]، [28]. بین تمامی متغیرهای اقلیمی همبستگی گرفته شد و هفت متغیر اقلیمی برای مدل‌سازی به کار گرفته شد (جدول ۱). نقشه پراکنش گونه براساس ۱۵ مرتبه اجرای مدل (تکرار) که بهترین مدل را برای گونه مورد مطالعه ارایه می‌دهد، استخراج گردید. برای ارزیابی نتایج مدل‌سازی نقشه‌های پراکنش از آماره تحلیل منحنی ویژگی عامل دریافت کننده^۱ استفاده شد. در صورتی که سطح زیر منحنی در رویکرد بی‌نظمی بیشینه ۰/۵ تا ۰/۷ باشد نشان‌دهنده پیش‌بینی یک مدل بهتر از حالت تصادفی است [29]، مقادیر ۰/۷-۰/۹. بیانگر یک مدل خوب و مقادیر بیش از ۰/۹ نشان‌دهنده پیش‌بینی بسیار عالی مدل است [30]. در نهایت از نرم‌افزار DIVA-GIS 7.3.0.1 برای ترسیم نقشه‌های پیش‌بینی شده براساس نقاط حضور گونه در زیستگاه‌ها استفاده شد [31].

۳- نتایج

مقادیر (Moran's I: 0.012; z-score: 6.344; p-value: 0.000) حاصل از شاخص جهانی موران خود همبستگی مکانی بین نقاط پراکنش سوسمار آذربایجانی را تایید کرد. براساس پیش‌بینی مدل‌ها، مهم‌ترین متغیرهای اساسی برای سوسمار آذربایجانی میزان بارش و تغییرات فصلی، بارش در سردترین سه ماه سال و دامنه تغییرات سالانه بودند. مقدار سطح زیر منحنی^۲ در این مطالعه برای آخرین بین یخبندان 0.001 ± 0.996 ، دوره هولوسن-میانی 0.002 ± 0.995 ، عصر حاضر 0.004 ± 0.993 و آینده (سال ۲۰۸۰: تحت سناریوهای RCP 2.6 و RCP 8.5) 0.001 ± 0.996 بوده که بیانگر پیش‌بینی عالی مدل‌ها است. سهم نسبی عملکردی هر متغیر برای دوره‌های گذشته، عصر حاضر و آینده در جدول ۱ و نقشه مطلوبیت زیستگاه‌ها و احتمال پراکنش سوسمار آذربایجانی در شکل ۲ ارایه گردیده است. بارش گرم‌ترین سه ماه سال، میانگین دمای سردترین سه ماه سال و دمای فصلی مهم‌ترین عوامل در شبیه‌سازی الگوی پراکنش *D. raddei raddei* در گذشته و آینده بودند. براساس نتایج حاصل از MaxEnt عوامل موثر بر مدل پراکنش سوسمار آذربایجانی در دوره معاصر میانگین دمای سردترین سه ماه سال، دمای فصلی و هم‌دمایی ذکر شده اند.



شکل ۱- الف- روستای جوشین-خاروانا، ب- جنگلهای ارسباران -خدآفرین، پ- ساپلاخ-هریس، ت- روستای کسانق - شهرستان اهر، ث- مشگین شهر، ج- اطراف معدن مس سونگون-ورزقان.

Figure 1- a. Joshin village - Kharvana, b. Arasbaran forests - Khodafarin, c. Saplah - Harris, d. Kasanagh village - Ahar city, e. Meshginshahr, f. Around the Songun copper mine - Varzeqan.

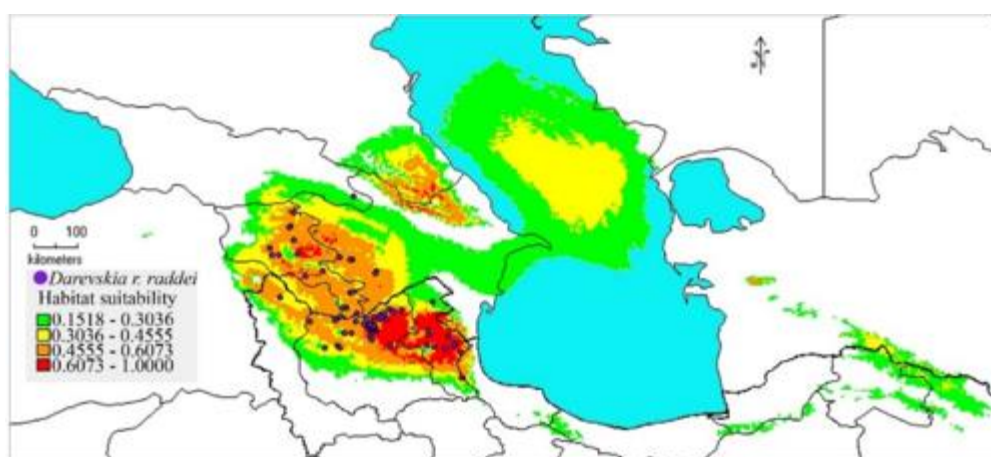
¹ Receiver Operating Characteristic Curve (ROC)

² Area under the curve

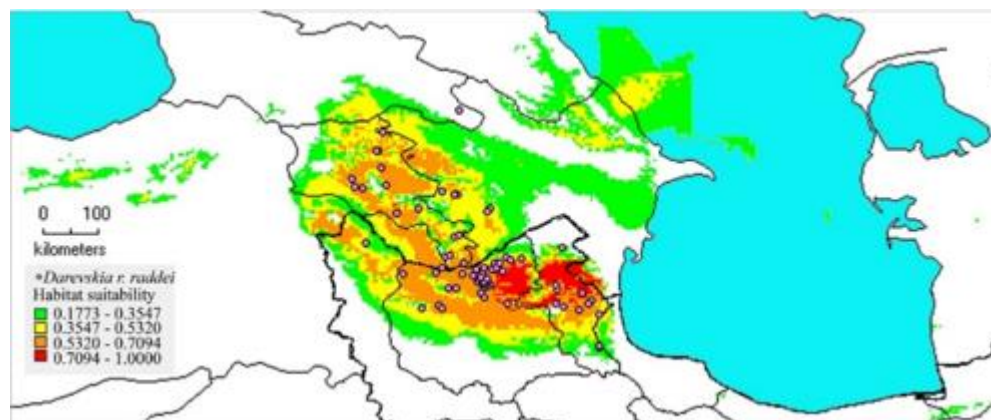
جدول ۱- نسبت متغیرهای مهم (درصدی) در آخرین بین یخبندان، هولوسن-میانی، دوره معاصر و آینده (سناریوهای RCP 2.6 و RCP 8.5 برای سال ۲۰۸۰) که در مدل MaxEnt برای سوسمار آذربایجانی *Darevskia raddei raddei* استفاده شده است.

Table 1- Relative of variables (in percentages) at the LIG, the MH, the contemporary, and future period (RCP 2.6 and RCP 8.5 scenarios for 2080) used in MaxEnt model for of the Azerbaijan lizard *Darevskia raddei raddei*.

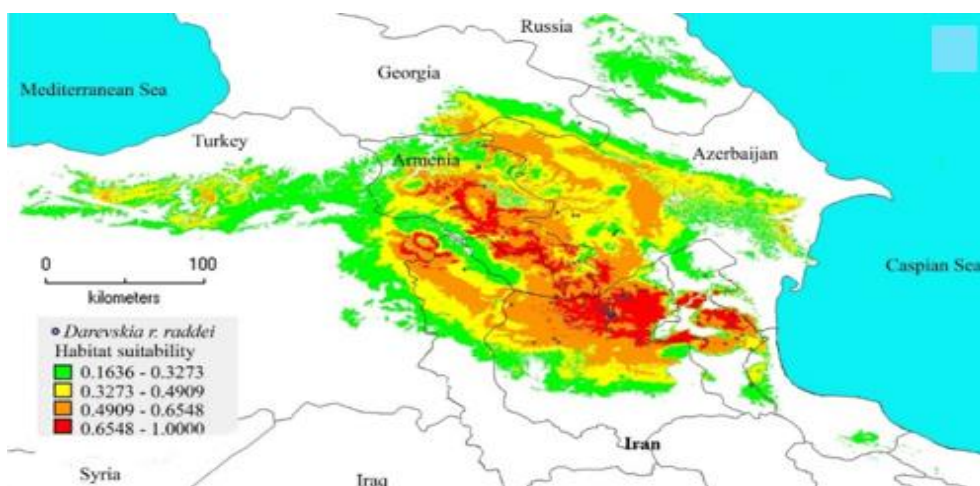
Variable	Description of Variables	LIG	MH	Present Time	2.6 Scenario	8.5 Scenario
Bio11	Mean temperature of the coldest quarter of the year	20.5	27	31.2	8	8
Bio4	Temperature seasonality (standard deviation * 100)	18.1	18.9	18.3	15.8	17
Bio3	Isothermality [(BIO2 / BIO7) * 100]	4.3	9.6	14.4	21.3	23.3
Bio19	Precipitation of the coldest quarter of the year	15.2	15.9	13.8	22.4	19.1
Bio18	Precipitation of the warmest quarter of the year	25.3	19.5	12.9	26	26.3
Bio2	Mean diurnal range [mean of monthly (max temp – min temp)]	3.5	9.1	5.1	6.4	6.3
Bio9	Mean temperature of the driest quarter of the year	13.1	0.1	0	0	0



a.



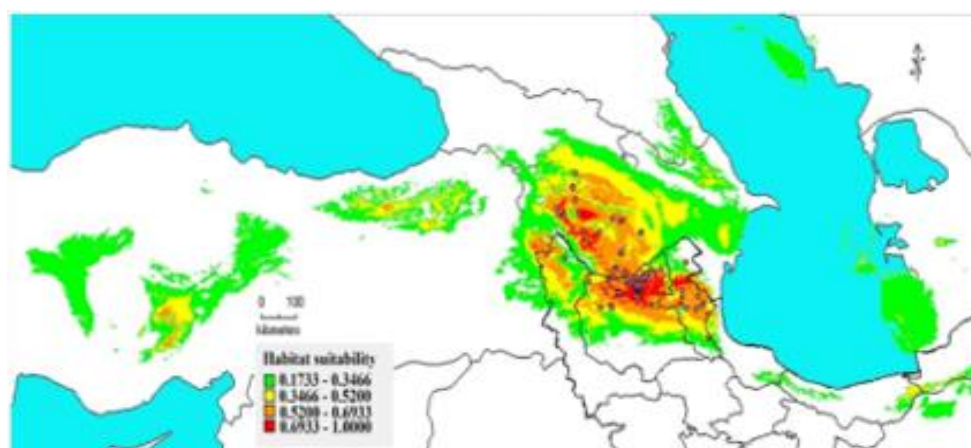
b.



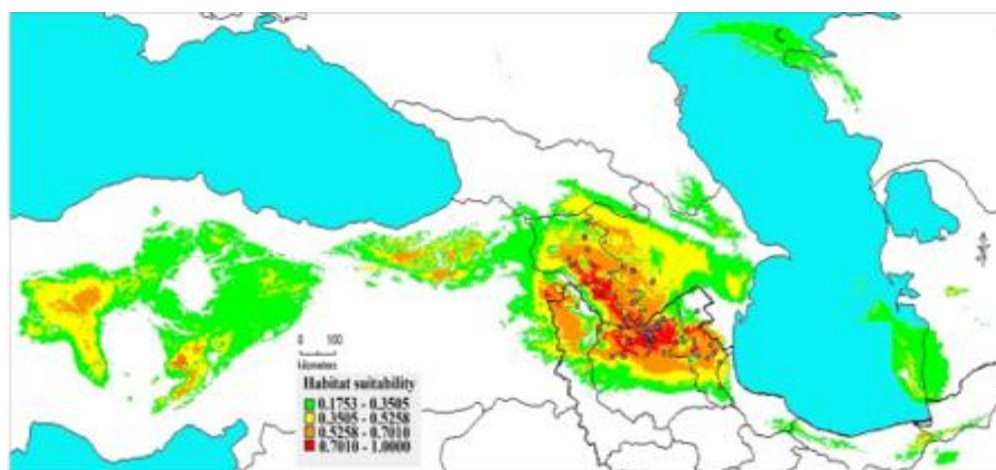
c.

شکل ۲- الگوی پراکنش بالقوه سوسمار آذربایجانی *Darevskia raddei raddei* در زیستگاه‌ها در دوره‌های الف- آخرین بین یخبندان، ب- هولوسن-میانی، ج- معاصر؛ دایره بیانگر حضور گونه و مربع‌ها در داخل شکل نشان دهنده مقدار مطلوبیت زیستگاه می‌باشند.

Figure 2- Pattern of potential distribution of the Azerbaijan lizard (*Darevskia r. raddei*) in habitats of periods; a. the last between of glacial, b. the Middle Holocene period, c. the contemporary period, the circle shows the presence of species and the squares in the figure shows the amount of habitat suitability.



a.



b.

شکل ۳- پیش بینی مطلوبیت زیستگاه و الگوی پراکنش سوسمار آذربایجانی (*Darevskia raddei raddei*) در سال ۲۰۸۰؛ الف- سناریو RCP 6.0، ب- سناریو RCP 8.5 دایره‌ها حضور گونه و مربع‌ها در داخل شکل میزان مناسب بودن زیستگاه را نشان می‌دهد.

Figure 3- Predicted habitat suitability and distribution model of the Azerbaijan lizard (*Darevskia raddei raddei*) during 2080; a. scenario RCP 6.0, b. scenario RCP 8.5. The circle shows the presence of species and the squares in the figure shows the amount of habitat suitability.

۴- بحث

حوادث دیرینه اقلیمی، باعث ایجاد نوسانات متعدد در محدوده پراکنش گونه‌ها می‌شوند، بررسی کلی طیف زمانی دامنه تغییرات از اهمیت حفاظتی برای گونه‌ها برخوردار است؛ زیرا گونه‌هایی که در گذشته دچار تغییر مکانی شده‌اند ممکن است در سناریوی تغییر اقلیم به کاهش یا جابه‌جایی دامنه پراکنش ادامه دهند [1]، خزندگان به هر گونه تغییر پایدار آب‌وهوا حساس می‌باشند؛ زیرا برای حفظ فرآیندهای فیزیولوژیکی حیاتی به دما و شرایط محیطی اطراف خود متکی هستند [32]. به نظر می‌رسد سوسماران در مناطق معتدل و کوهستانی در برابر تغییرات آب‌وهوایی بسیار آسیب‌پذیر هستند [33]، [34]. تولیدمثل آن‌ها در بهار و تابستان که رژیم‌های دما و رطوبت مناسب برای فعالیت‌های حیاتی تاریخ طبیعی هستند، اتفاق می‌افتد. تغییر شرایط آب‌وهوایی در طول این فصول ممکن است منجر به شکست تولیدمثل، مرگ‌ومیر مرتبط با گرم‌شدن ناگهانی در زمستان، اثرات متقابل جوامع گیاهی تغییر یافته و بیماری بالقوه شود. نتایج شاخص موران و رویکردی پیشینه بی‌نظمی نشان داد سوسمار آذربایجانی دارای الگوی پراکنش متراکم و تحت‌تأثیر میزان دمای ماهیانه، فصلی و بارش فصلی بوده است که مانند دیگر سوسماران از جمله *Ablepharus* وابستگی تاریخی به بارش و دما دارد [35]. سیلرو و کارتر [1] در بررسی تغییر دامنه پراکنش گونه *Podarcis carbonelli Pérez-Mellado, 1981* از خانواده *Lacertidae* در راستای تغییر اقلیم در دوره‌های مختلف زمانی (آخرین بین‌یخبندان، آخرین حداکثر یخبندان، معاصر و آینده) نشان دادند که دامنه پراکنش آن در دوره آخرین بین‌یخبندان نسبت به دوره‌های دیگر کاهش نسبی را نشان می‌دهد و دامنه پراکندگی آن در جهت مناطق مرطوب و دمای پایین شمالی تغییر کرده است که همین مساله در گونه مورد مطالعه در این تحقیق هم مصداق دارد. در برخی از گونه‌های جانوری ممکن است الگوی پراکنش با تغییر اقلیم دچار نوسان شدیدی شود مانند آن‌چه در الگوی پراکندگی گگوی پلنگی (*Eublepharis angramainyu* Anderson & Leviton, 1966) رخ داده است، الگوی پراکنش گگو پلنگی در دوره هولوسن-میانی نسبت به دوره‌های آخرین بین‌یخبندان، عصر حاضر و الگوی پراکنش پیش‌بینی‌شده در ۲۰۵۰ بسیار گسترده‌تر نشان داده شده است [35]؛ پس می‌توان گفت تغییر اقلیم توانسته است که در الگوی پراکنش گروه‌های مختلف جانوری تأثیر بسزایی گذاشته است. دیرینه اقلیم‌شناسان بیان کرده‌اند که دوره آخر بین‌یخبندان (حدود ۱۲۰۰۰۰ سال پیش) در طول تابستان در نیم‌کره شمالی، به دلیل تغییر در مدار زمین، توزیع تابش خورشیدی بر روی زمین، میانگین دمای سالانه سطح جهانی حدود ۱ تا ۲ درجه سانتیگراد گرم‌تر قبل از صنعتی شدن بوده و دمای سطح ارتفاعات حداقل ۲ درجه سانتیگراد گرم‌تر از عصر حاضر بوده است (ncei.noaa.gov)، احتمال می‌رود که محدودیت زیستگاه‌های مناسب و مطلوب *Darevskia raddei raddei* در گذشته همین بوده باشد. هم‌چنین در هولوسن-میانی (تقریباً ۶۰۰۰ سال پیش)، به دلیل تغییرات آهسته در طول هزاران و میلیون‌ها سال در مدار زمین، میزان تابش خورشیدی که به زمین می‌رسد تغییر کرده است؛ این تغییرات مداری باعث گردیده است که در اواسط هولوسن در نیم‌کره شمالی تابستان گرم‌تر و زمستان سردتر از عصر حاضر بوده است که می‌تواند دلیلی بر کم بودن وسعت زیستگاه‌های مناسب نسبت به عصر حاضر در گونه مورد مطالعه باشد. مدل‌های حاصل از رویکرد حداکثر آنتروپی، منطقه مناسب بزرگ‌تری را نسبت به منطقه اشغال‌شده در حال حاضر *D. raddei raddei*، نشان دادند. اگرچه مناسب‌ترین نواحی تا حد زیادی با جمعیت‌های مشاهده‌شده مطابقت دارد (شکل ۲). مناطق دیگری نیز وجود دارند که آب‌وهوا مناسب است اما حضور گونه ثبت نشده است. این مورد در مورد مناطق از شرق ترکیه، شمال غربی ایران (آذربایجان غربی: ماکو)، جنوب ارمنستان، بخش‌هایی از آذربایجان و نخجوان است. اگرچه، جستجوهای بیش‌تر می‌تواند جمعیت‌های جدا شده‌ای از این گونه را در مناطق دیگر پیدا کند. متغیرهایی که بیش‌ترین کمک را به مدل داشتند عبارتند از میانگین دمای سردترین سه ماه سال (۵- درجه سانتیگراد)، بارش گرم‌ترین سه ماه سال (۷۹ میلی‌متر) و دمای فصلی. از این سه، تنها میانگین دمای سردترین سه ماه سال سهم بالایی داشت (جدول ۱). تحقیقات تطبیقی بیش‌تر در مورد ریختی و بوم-فیزیولوژی برای تعیین علل نزدیکی این الگو مورد نیاز است. با این وجود، زیستگاه‌هایی که گونه‌ها در آن زندگی می‌کنند ممکن است کاملاً متفاوت باشند (شکل ۱) مانند جنگل‌های بلوط و تپه‌های سنگلاخی. با این حال، آب‌وهوا را می‌توان مشابه، با دمای متوسط و سطوح بالای رطوبت در نظر گرفت. در آینده (سال ۲۰۸۰) براساس سناریو RCP 2.6 که غلظت گازهای گلخانه‌ای دارای اوج (اواسط قرن حاضر) و نزول (سال ۲۱۰۰) پیش‌بینی می‌شود مناسب ماندن زیستگاه‌ها و الگوی پراکنش سوسمار آذربایجانی روند کاهشی را داشته باشد، ولی بر پایه سناریو RCP 8.5 که غلظت گازهای گلخانه‌ای با گذشت زمان هم‌چنان بالا خواهد رفت، علاوه بر کاهش مطلوبیت زیستگاهی و پراکنش در کشورهای آذربایجان، ارمنستان و ایران، مناطقی از شمال شرقی استان‌های اردبیل، آذربایجان شرقی و غربی کاملاً برای بقا گونه مورد مطالعه نامناسب و در عین حال مناطقی از شرق و مرکز ترکیه دارای مطلوبیت زیستگاهی خوبی خواهند شد.

۵- نتیجه گیری

مدیریت حفظ و احیای زیستگاه‌های موجود برای خزندگان، افزایش سطح زیستگاه دست نخورده و انطباق اقدامات مدیریتی برای کاهش عوامل استرس‌زای محیطی اهمیت اساسی دارد. از آنجایی که ریزاقلیم‌ها را می‌توان به آسانی با فعالیت‌های مدیریت زمین محلی دست‌کاری کرد، مردم می‌توانند به‌طور فعال آینده‌ای را برای برخی از این موجودات مهندسی کنند، به‌ویژه زمانی که محیط‌های آن‌ها در حال حاضر به دلیل فعالیت‌های انسانی بسیار تغییر کرده است. در حال حاضر محافظت نمی‌شود؛ اما سزاوار اولویت حفاظت است.

سپاس‌گزاری

بدین‌وسیله از آقای علی دهقانی که ما را در کار میدانی یاری نمودند تشکر می‌کنیم.

تعارض منافع

بدین‌وسیله نویسندگان نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچ تضاد منافی ندارند.

منابع

- [1] Sillero, N., & Carretero, M. A. (2013). Modelling the past and future distribution of contracting species. The Iberian lizard *podarcis carbonelli* (squamata: lacertidae) as a case study. *Zoologischer anzeiger - a journal of comparative zoology*, 252(3), 289–298. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044523112000629>
- [2] Phillips, S. J., Dudík, M., Elith, J., Graham, C. H., Lehmann, A., Leathwick, J., & Ferrier, S. (2009). Sample selection bias and presence-only distribution models: implications for background and pseudo-absence data. *Ecological applications*, 19(1), 181–197. <https://esajournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1890/07-2153.1>
- [3] Thomas, C. D., Cameron, A., Green, R. E., Bakkenes, M., Beaumont, L. J., Collingham, Y. C., ... & Williams, S. E. (2004). Extinction risk from climate change. *Nature*, 427(6970), 145–148. <https://doi.org/10.1038/nature02121>
- [4] Graham, C. H., Ferrier, S., Huettman, F., Moritz, C., & Peterson, A. T. (2004). New developments in museum-based informatics and applications in biodiversity analysis. *Trends in ecology and evolution*, 19(9), 497–503. [https://www.cell.com/trends/ecology-evolution/fulltext/S0169-5347\(04\)00203-4?large_figure=true](https://www.cell.com/trends/ecology-evolution/fulltext/S0169-5347(04)00203-4?large_figure=true)
- [5] Kleidon, A., & Mooney, H. A. (2000). A global distribution of biodiversity inferred from climatic constraints: results from a process-based modelling study. *Global change biology*, 6(5), 507–523. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1365-2486.2000.00332.x>
- [6] Ramirez-Villegas, J., Cuesta, F., Devenish, C., Peralvo, M., Jarvis, A., & Arnillas, C. A. (2014). Using species distributions models for designing conservation strategies of Tropical Andean biodiversity under climate change. *Journal for nature conservation*, 22(5), 391–404. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1617138114000387>
- [7] Karamiani, R., Rastegar-Pouyani, N., & Rastegarpouyani, E. (2018). Modeling the past and current distribution and habitat suitability for *Ablepharus grayanus* and *A. pannonicus* (sauria: scincidae). *Asian herpetological research*, 9(1), 56–64.
- [8] Elith, J., H. Graham, C., P. Anderson, R., Dudík, M., Ferrier, S., Guisan, A., ... & E. Zimmermann, N. (2006). Novel methods improve prediction of species' distributions from occurrence data. *Ecography*, 29(2), 129–151. <https://nsojournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.2006.0906-7590.04596.x>
- [9] Pearson, R. G., Raxworthy, C. J., Nakamura, M., & Townsend Peterson, A. (2007). Predicting species distributions from small numbers of occurrence records: a test case using cryptic geckos in Madagascar. *Journal of biogeography*, 34(1), 102–117. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2699.2006.01594.x>
- [10] Miao, C., Duan, Q., Sun, Q., & Li, J. (2013). Evaluation and application of Bayesian multi-model estimation in temperature simulations. *Progress in physical geography: earth and environment*, 37(6), 727–744. <https://doi.org/10.1177/0309133313494961>
- [11] Moss, R. H., Edmonds, J. A., Hibbard, K. A., Manning, M. R., Rose, S. K., van Vuuren, D. P., ... & Wilbanks, T. J. (2010). The next generation of scenarios for climate change research and assessment. *Nature*, 463(7282), 747–756. <https://doi.org/10.1038/nature08823>
- [12] Aghakhani Afshar, A., Hassanzadeh, Y., Besalatpour, A. A., & Pourreza Bilondi, M. (2017). Annual assessment of Kashafrud watershed basin climate components in future periods by using fifth report of intergovernmental panel on climate change. *Journal of water and soil conservation*, 23(6), 217–233. https://jwsc.gau.ac.ir/article_3486.html
- [13] Gunaratna, N., Liu, Y., & Park, J. (2013). Spatial autocorrelation. *Journal of recuperado EL*, 2, 1–14. <https://www.stat.purdue.edu/~bacraig/SCS/Spatial Correlation new.doc>
- [14] Hosseini, S. (2021). Climate change and its effects on the distribution pattern of critically endangered lizards in Iran. *Journal of animal environment*, 13(4), 137–142. http://www.aejournal.ir/article_163061.html

- [15] Kafash, A., Kaboli, M., Koehler, G., Yousefi, M., & Asadi, A. (2016). Ensemble distribution modeling of the Mesopotamian spiny-tailed lizard, *Saara loricata* (Blanford, 1874), in Iran: an insight into the impact of climate change. *Turkish journal of zoology*, 40(2), 262–271. <https://journals.tubitak.gov.tr/zoology/vol40/iss2/15/>
- [16] Moreno-Rueda, G., Pleguezuelos, J. M., Pizarro, M., & Montori, A. (2012). Northward shifts of the distributions of Spanish reptiles in association with climate change. *Conservation biology*, 26(2), 278–283. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1523-1739.2011.01793.x>
- [17] Ahmadzadeh, F., Flecks, M., Carretero, M. A., Mozaffari, O., Böhme, W., Harris, D. J., ... & Rödder, D. (2013). Cryptic speciation patterns in Iranian rock lizards uncovered by integrative taxonomy. *PloS one*, 8(12), e80563. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0080563>
- [18] Arnold, E. N., Arribas, O., & Carranza, S. (2007). Systematics of the palaearctic and oriental lizard tribe lacertini (squamata: lacertidae: lacertinae), with descriptions of eight new genera. *Zootaxa*, 1430(1), 1–86. <https://www.biotaxa.org/Zootaxa/article/view/zootaxa.1430.1.1>
- [19] Nasrullah, R. P., Rasoul, K., Hamzeh, O., Azar, K., & Eskandar, R. P. (2012). A new subspecies of *darevskia raddei* (Boettger, 1892)(Sauria: Lacertidae) from the West Azerbaijan province, Iran. *Asian herpetological research*, 2(4), 216–222. https://lacertilia.de/AF/Bibliografie/BIB_6416.pdf
- [20] Freitas, S., Rocha, S., Campos, J., Ahmadzadeh, F., Corti, C., Sillero, N., ... & Carretero, M. A. (2016). Parthenogenesis through the ice ages: a biogeographic analysis of Caucasian rock lizards (genus *Darevskia*). *Molecular phylogenetics and evolution*, 102, 117–127. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1055790316301233>
- [21] Dehghani, A., Hosseinian Yousefkhani, S. S., Rastegar-Pouyani, N., Banan-Khojasteh, S. M., & Mohammadpour, A. (2014). Sexual size dimorphism in *darevskia raddei* (sauria: lacertidae) from northwestern Iran. *Zoology in the middle east*, 60(2), 120–124. <https://doi.org/10.1080/09397140.2014.914715>
- [22] Argaña, E., Freitas, S., Sillero, N., Corti, C., Drovetski, S. V., Garcia-Muñoz, E., ... & Carretero, M. A. (2013). An apparent case of bilateral gynandromorphy in the femoral pores of the Caucasian rock lizard *Darevskia raddei*. *Herpetology notes*, 6(1), 77–80. https://www.academia.edu/download/53580351/An_apparent_case_of_bilateral_gynandromo20170619-2985-19dseje.pdf
- [23] Grechko, V. V., Bannikova, A. A., Kosushkin, S. A., Ryabinina, N. L., Milto, K. D., Darevsky, I. S., & Kramerov, D. A. (2007). Molecular genetic diversification of the lizard complex *darevskia raddei* (sauria: lacertidae): early stages of speciation. *Molecular biology*, 41(5), 764–775. <https://doi.org/10.1134/S0026893307050093>
- [24] van Vuuren, D. P., den Elzen, M. G. J., Lucas, P. L., Eickhout, B., Strengers, B. J., van Ruijven, B., ... & Van Houtdt, R. (2007). Stabilizing greenhouse gas concentrations at low levels: an assessment of reduction strategies and costs. *Climatic change*, 81(2), 119–159. <https://doi.org/10.1007/s10584-006-9172-9>
- [25] Riahi, K., Grübler, A., & Nakicenovic, N. (2007). Scenarios of long-term socio-economic and environmental development under climate stabilization. *Technological forecasting and social change*, 74(7), 887–935. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040162506001387>
- [26] de Souza Muñoz, M. E., De Giovanni, R., de Siqueira, M. F., Sutton, T., Brewer, P., Pereira, R. S., ... & Canhos, V. P. (2011). Openmodeller: a generic approach to species' potential distribution modelling. *GeoInformatica*, 15(1), 111–135. <https://doi.org/10.1007/s10707-009-0090-7>
- [27] Rissler, L. J., Hijmans, R. J., Graham, C. H., Moritz, C., & Wake, D. B. (2006). Phylogeographic lineages and species comparisons in conservation analyses: a case study of california herpetofauna. *The american naturalist*, 167(5), 655–666. <https://doi.org/10.1086/503332>
- [28] Hosseinzadeh, M. S., Farhadi Qomi, M., Naimi, B., Roedder, D., & KAZEMI, S. M. (2018). Habitat suitability and modelling the potential distribution of the plateau snake skink *ophiomorus nuchalis* (sauria: scincidae) on the Iranian plateau. *North-western journal of zoology*, 14(1). http://macroecointern.dk/pdf-reprints/Hosseinzadeh_NWJZ_2018.pdf
- [29] Gallien, L., Douzet, R., Pratte, S., Zimmermann, N. E., & Thuiller, W. (2012). Invasive species distribution models – how violating the equilibrium assumption can create new insights. *Global ecology and biogeography*, 21(11), 1126–1136. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1466-8238.2012.00768.x>
- [30] Manel, S., Williams, H. C., & Ormerod, S. J. (2001). Evaluating presence-absence models in ecology: the need to account for prevalence. *Journal of applied ecology*, 38(5), 921–931. <https://besjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1365-2664.2001.00647.x>
- [31] Hijmans, R., Guarino, L., Cruz, M., & Rojas, E. (2000). Computer tools for spatial analysis of plant genetic resources data: 1. DIVA-GIS. *Plant genetics research newsletter*, 127, 15–19. https://www.diva-gis.org/docs/pgr127_15-19.pdf
- [32] Vose, J. M., & Klepzig, K. D. (2013). *Climate change adaptation and mitigation management options: a guide for natural resource managers in southern forest ecosystems*. Taylor & Francis.
- [33] Zani, P. A., & Rollyson, M. E. (2011). The effects of climate modes on growing-season length and timing of reproduction in the pacific northwest as revealed by biophysical modeling of lizards. *The american midland naturalist*, 165(2), 372–388. <https://doi.org/10.1674/0003-0031-165.2.372>
- [34] Araújo, M. B., Thuiller, W., & Pearson, R. G. (2006). Climate warming and the decline of amphibians and reptiles in Europe. *Journal of biogeography*, 33(10), 1712–1728. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2006.01482.x>
- [35] Karamiani, R., & Rastegar-Pouyani, N. (2021). The effect of climate change on habitat suitability and a distribution model of the Iranian fat-tailed gecko, *Eublepharis angramainyu* Anderson and Leviton, 1966 (sauria: eublepharidae) since the last interglacial to 2050. *Zoology and ecology*, 31, 24–32. https://www.researchgate.net/profile/Rasoul-Karamiani-2/publication/354733268_

ضمیمه الف

جدول الف ۱ - متغیرهای زیست اقلیمی مورد استفاده در مدل ها (www.worldclim.org).

Table A 1- Bioclimatic variables used at models (www.worldclim.org).

Characters	Definition	توضیح
BIO1	Annual mean temperature	میانگین دمای سالانه
BIO2	Mean diurnal range [mean of monthly (max temp - min temp)]	میانگین دمایی روز (میانگین ماهیانه بیشترین دما - کمترین دما)
BIO3	Isothermality [(BIO2 / BIO7) * 100]	همدمایی
BIO4	Temperature seasonality (standard deviation * 100)	دمای فصلی (انحراف معیار × ۱۰۰)
BIO5	Maximum temperature of the warmest month	بیشترین دمای گرمترین ماه
BIO6	Minimum temperature of the coldest month	کمترین دمای سردترین ماه
BIO7	Temperature annual range (BIO5 - BIO6)	میانگین دمای سالانه
BIO8	Mean temperature of the wettest quarter of the year	میانگین دمای مرطوبترین فصل سال
BIO9	Mean temperature of the driest quarter of the year	میانگین دمای خشکترین فصل سال
BIO10	Mean temperature of the warmest quarter of the year	میانگین دمای گرمترین فصل سال
BIO11	Mean temperature of the coldest quarter of the year	میانگین دمای سردترین فصل سال
BIO12	Annual precipitation	بارش سالانه
BIO13	Precipitation of the wettest month	بارش گرمترین ماه
BIO14	Precipitation of the driest month	بارش خشکترین ماه
BIO15	Precipitation seasonality (standard deviation / mean)	بارش فصلی (انحراف معیار/ میانگین)
BIO16	Precipitation of the wettest quarter of the year	بارش مرطوبترین فصل سال
BIO17	Precipitation of the driest quarter of the year	بارش خشکترین فصل سال
BIO18	Precipitation of the warmest quarter of the year	بارش گرمترین فصل سال
BIO19	Precipitation of the coldest quarter of the year	بارش سردترین فصل سال

Paper Type: Original Article



Investigating the Effect of Chemical Substance Concentration and 50% Limit of Access to Drinking Water on Productive Performance, Egg Quality and Biochemical and Hematological Indicators of Blood Of Laying hens

Hossein Noornia¹, Reza Vakili^{1*}, Saeid Sobhanirad², Mahdi Elahi¹

¹ Department of animal science, Kashmar Branch, Kashmar, Iran; PhD Student, hosseinm13418@gmail.com; Associate Professor, rezavakili2010@yahoo.com.

² Department of animal science, Mashhad Branch, Mashhad, Iran; Assistant Professor, sobhanirad@gmail.com; Assistant Professor, elahi222@gmail.com.

Citation:

Noornia, H., Vakili, R., Sobhanirad, S., & Elahi, M. (2023). Investigating the effect of chemical substance concentration and 50% limit of access to drinking water on productive performance, egg quality and biochemical and hematological indicators of blood of laying hens. *The quarterly scientific journal of applied biology*, 36(3), 104-115.

Received: 15/10/2022

Accepted: 17/09/2023

Abstract

Introduction: The limitation of fresh water resources is an important challenge in livestock and poultry industry, especially in arid and semi-arid regions. Also, climate changes are reflected in global warming and decrease in rainfall, which in turn may increase soil and water salinity.

Methods: A total of 240 laying hens of highline commercial strain at the age of 34 to 37 weeks with an average weight (1345 ± 35 g) were tested completely randomly with 4 treatments and 5 replications (12 birds). Experimental treatments include treatment 1: (control) chickens with free access to drinking water, treatment 2: free access to water with a low concentration of chemicals (during the day), treatment 3: free access to water with a high concentration of chemicals (during day), treatment 4: access to water with a low concentration of chemicals and a 50% restriction in daily water consumption (every day), and treatment 5: access to water with a low concentration of chemicals and a 50% restriction in daily water consumption every were day and night.

Results: Performance indicators including egg laying percentage, daily egg production, feed consumption, feed conversion ratio and water consumption were significantly affected by the treatments ($P < 0.05$). Egg white and shell weight, specific gravity, egg shell shape and thickness index, corticosterone, aspartate aminotransferase enzyme, phosphorus, potassium, sodium, chlorine and blood calcium index as well as the number of white blood cells, number of red blood cells, hemoglobin and hematocrit under the influence of experimental treatments were not placed ($P > 0.05$). According to previous studies, egg production is not affected by 4000 ppm added sodium chloride. Also, by investigating the effect of high salt concentration (up to 600 ppm) in water, it has been reported on 60-week-old chickens that daily feed consumption, egg production and egg weight are not affected by water salinity.

Conclusion: In general, the presence of chemical compounds and heavy elements in the water used by poultry can partially reduce the quality of eggs.

Keywords: Chemical water pollutants, Eggs, Water quality, Restrictions, Laying hens.



Corresponding Author: rezavakili2010@yahoo.com



<https://doi.org/10.22051/jab.2023.43335.1555>



بررسی اثر غلظت مواد شیمیایی و محدودیت ۵۰٪ در آب آشامیدنی بر عملکرد تولیدی، کیفیت تخم مرغ، شاخص‌های بیوشیمیایی و هماتولوژی خون مرغ‌های تخم‌گذار

حسین نورنیا^۱، رضا وکیلی^۱، سعید سبحانی راد^۲، مهدی الهی ترشیز^۱

^۱گروه علوم دامی واحد کاشمر دانشگاه آزاد اسلامی، کاشمر، ایران.

^۲گروه علوم دامی واحد مشهد دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران.

چکیده

مقدمه: محدودیت منابع آب شیرین، چالش مهمی در صنعت دام و طیور، به‌ویژه در مناطق خشک و نیمه‌خشک است. هم‌چنین تغییرات آب و هوایی در گرم شدن کره زمین و کاهش بارندگی منعکس می‌شود که به‌نوبه خود ممکن است باعث افزایش شوری خاک و آب شود.

روش‌ها: تعداد ۲۴۰ قطعه مرغ تخم‌گذار سویه تجاری هایلین در سن ۳۴ تا ۳۷ هفتگی با میانگین وزن (1345 ± 35 گرم) به‌طور کاملاً تصادفی با ۴ تیمار و ۵ تکرار (۱۲ پرند) مورد آزمایش قرار گرفتند. تیمارهای آزمایشی شامل تیمار ۱: (شاهد) مرغ‌ها با دسترسی آزاد به آب آشامیدنی، تیمار ۲: دسترسی آزاد به آب با غلظت کم مواد شیمیایی (در طول روز)، تیمار ۳: دسترسی آزاد به آب با غلظت بالای مواد شیمیایی (در طول روز)، تیمار ۴: دسترسی به آب با غلظت پایین مواد شیمیایی و محدودیت ۵۰٪ در آب مصرفی روزانه (هر شبانه-روز) و تیمار ۵: دسترسی به آب با غلظت پایین مواد شیمیایی و محدودیت ۵۰٪ در آب مصرفی روزانه (هر شبانه-روز) بودند.

یافته‌ها: شاخص‌های عملکرد شامل درصد تخم‌گذاری، تخم مرغ تولیدی روزانه، مصرف خوراک، ضریب تبدیل خوراک و آب مصرفی به‌طور معنی‌داری تحت تاثیر تیمارها قرار گرفتند ($P < 0.05$). وزن سفیده و پوسته تخم مرغ، وزن مخصوص، شاخص شکل و ضخامت پوسته تخم مرغ، کورتیکوسترون، آنزیم آسپارات آمینوترانسفراز، فسفر، پتاسیم، سدیم، کلر و شاخص کلسیم خون و هم‌چنین تعداد گلبول‌های سفید، تعداد گلبول‌های قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفتند ($P > 0.05$). با توجه به مطالعات گذشته مشخص شد، تولید تخم مرغ تحت تاثیر ۴۰۰۰ ppm کلرید سدیم اضافه‌شده قرار نمی‌گیرد. هم‌چنین با بررسی اثر غلظت بالای نمک (تا ۶۰۰ ppm) در آب، روی مرغ‌های ۶۰ هفته‌ای گزارش شده است که مصرف خوراک روزانه، تولید تخم مرغ و وزن تخم مرغ تحت تاثیر شوری آب قرار نمی‌گیرد.

نتیجه‌گیری: به‌طور کلی وجود ترکیبات شیمیایی و عناصر سنگین در آب مورد استفاده طیور می‌تواند تا حدی سبب کاهش کیفیت تخم مرغ شود.

کلیدواژه‌ها: آلاینده‌های شیمیایی آب، تخم مرغ، کیفیت آب، محدودیت، مرغ تخم‌گذار.

۱- مقدمه

دسترسی محدود به آب یا وجود آلاینده‌ها در منبع، تاثیر قابل توجهی بر سلامت و بهره‌وری حیوانات مزرعه‌ای دارد. نیاز آب حیوانات اهلی نیز ممکن است با نیازهای جمعیت انسانی و آب مورد نیاز برای تولید محصولات کشاورزی رقابت کند [1]. آب تقریباً ۷۵٪ از کل مولکول‌های بدن را در دام تشکیل می‌دهد [2] و برای تنظیم دمای بدن، رشد، تولیدمثل و شیردهی، هضم، دفع و هیدرولیز پروتئین، متابولیسم چربی و کربوهیدرات، تنظیم هموستاز معدنی، روان کننده مفاصل، تقویت سیستم عصبی، انتقال صدا و بینایی مورد نیاز است [3]. در طیور، آب بین ۵۵٪ تا ۷۵٪ وزن مرغ، ۶۵٪ تخم مرغ، حدود ۷۰٪ در داخل سلول‌ها و ۳۰٪ در مایع اطراف سلول‌ها و خون را به خود اختصاص داده است [4].

محدودیت منابع آب شیرین و تغییرات آب و هوایی چالش مهمی در صنعت دام و طیور به ویژه در مناطق خشک و نیمه خشک است که باید مورد توجه قرار گیرد. هم چنین تغییرات آب و هوایی، در گرم شدن کره زمین و کاهش بارندگی منعکس می شود که به نوبه خود ممکن است باعث افزایش شوری خاک و آب شود. با این حال، آب های زیرزمینی شوری بالایی دارند و هزینه نمک زدایی گران است. توانایی حیوانات در تحمل آب شور به گونه جانوری، سطوح شوری و نوع مواد معدنی نمک موجود در آب بستگی دارد [5]. در مناطقی از جهان، منبع آب مصرفی طیور، آب شور است و کیفیت و کمیت املاح در تغذیه طیور نقش مهمی دارد [6].

مقدار تولیدات طیور به کیفیت آب بستگی دارد؛ کیفیت پایین آب می تواند در فرآیند هضم، اختلال ایجاد کرده و به دنبال آن عملکرد پرنده را تحت تاثیر قرار دهد [7]. تغییر در کیفیت آب آشامیدنی ممکن است باعث تغییر در عملکرد مرغ های تخم گذار شود. نتایج پژوهشی که از دو منبع آب، شامل آبی که حاوی غلظت ۱۹۰ و ۲۱۰ سدیم و کلر و در مقایسه با منبع آب شهری حاوی غلظت ۲۹ و ۸۰ سدیم و کلر، به مدت ۴ هفته روی مرغ های تخم گذار مورد مطالعه قرار گرفت؛ نشان داد که مصرف آب چاه (آب مصرفی در کشاورزی) در مقایسه با آب شهری کمتر بود. هم چنین تولید، بازدهی تخم مرغ، وزن تخم مرغ و رطوبت کود نیز تحت تاثیر قرار گرفتند. در این مطالعه مشخص شد، ممکن است کیفیت آب روی عملکرد مرغ های تخم گذار موثر باشد [8].

سطح بالای مواد معدنی در آب شور ممکن است سبب ایجاد پوسته معیوب در تخم ها شود، به ویژه کاهش ضخامت و کلسیم پوسته، افزایش تعداد تخم های آسیب دیده و افزایش کلسیم و فسفر پلاسما در مرغ های تخم گذار، هم چنین ممکن است ترکیبات خون با نوشیدن آب شور تغییر کنند [9] ، [10]. مشخص شده است که استفاده از آب شور در مقایسه با آب شهری در جیره مرغ های تخم گذار، صفات کیفی و وزن پوسته تخم مرغ را به صورت معنی داری کاهش می دهد و سبب افزایش نقایص پوسته می شود [11]. هدف از انجام این مطالعه بررسی اثر غلظت مواد شیمیایی و محدودیت ۵۰٪ در آب آشامیدنی، بر عملکرد تولیدی، کیفیت تخم مرغ و شاخص های بیوشیمیایی و هماتولوژی خون مرغ های تخم گذار می باشد.

۲- مواد و روش ها

۲-۱- جمع آوری نمونه های مشکوک

این طرح در تاریخ ۱۴ اسفند سال ۱۴۰۰، در یکی از سالن های مرغ تخم گذار، واقع در استان خراسان رضوی، شهرستان کاشمر، به مدت ۴۵ روز (۱۴ روز عادت پذیری مرغ ها به خوراک و محیط طرح، ۲۸ روز دوره اصلی) انجام شد؛ برای این منظور تعداد ۲۴۰ قطعه مرغ تخم گذار سویه تجاری هایالین از سن ۳۴ تا ۳۷ هفتگی با میانگین وزن یکسان (1345 ± 35) در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تیمار و ۵ تکرار که در هر تکرار ۱۲ پرنده وجود داشت، مورد آزمایش قرار گرفتند. به منظور پاک سازی آلودگی و دانه های باقی مانده، شست و شوی قفس ها صورت گرفت. هم چنین به وسیله سیم های مفتول، محل جمع آوری تخم مرغ از هم جدا شدند تا از مخلوط شدن تخم مرغ های هر واحد با واحد مجاور جلوگیری شود.

برنامه نوردهی به صورت ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای سالن حدود ۱۶ تا ۱۸ درجه سانتی گراد تنظیم گردید. تیمارهای آزمایشی شامل تیمار ۱ (شاهد): مرغ ها با دسترسی آزاد به آب آشامیدنی، تیمار ۲: دسترسی آزاد به آب با غلظت کم مواد شیمیایی (در طول روز)، تیمار ۳: دسترسی آزاد به آب با غلظت بالای مواد شیمیایی (در طول روز)، تیمار ۴: دسترسی به آب با غلظت پایین مواد شیمیایی و محدودیت ۵۰٪ در آب مصرفی روزانه (هر شبانه روز)، تیمار ۵: دسترسی به آب با غلظت بالای مواد شیمیایی و محدودیت ۵۰٪ در آب مصرفی روزانه (هر شبانه روز) بودند [12]. آنالیز ترکیبات تشکیل دهنده جیره در جدول ۱ گزارش شده است.

جدول ۱- درصد ترکیبات تشکیل دهنده جیره مرغ‌های تخم‌گذار.

Table 1- The percentage of components of the diet of laying hens.

Ingredients	Percent (%)	Ingredients	Percent (%)
Corn	54.20	Lysine	0.10
Soybean	25.00	Crude protein	15.15
Calcium carbonate	10.00	Calcium	4.65
Vegetable oil	1.40	Available phosphorus	0.40
Wheat bran	6.00	Sodium	0.18
Di-calcium phosphate	2.20	Methionine	0.38
Salt	0.25	Methionine-cysteine	0.65
NaHCO ₃	0.15	Lysine	0.80
Vitamin supplement*	0.25	Arginine	0.90
Mineral supplement**	0.25	Threonine	0.59
DL Methionine	0.20	Computational ratio analysis metabolizable energy	2810.00 (kcal/kg)

* ترکیب مکمل ویتامینه برای هر کیلوگرم جیره شامل: ۳۲۰۰۰۰ واحد بین‌المللی بر کیلوگرم ویتامین A، ۱۳۲۰۰۰۰ واحد بین‌المللی بر کیلوگرم ویتامین D3، ۸۰۰۰ واحد بین‌المللی بر کیلوگرم ویتامین E، ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین K3، ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین B1، ۲۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین B2، ۳۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین کالبان، ۱۲۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نیاسین، ۱۶۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم B6، ۳۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم B9، ۹ میلی‌گرم بر کیلوگرم B12، ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بیوتین، ۴۴۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کولین، آنتی‌اکسیدان ۳۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم.

** مکمل معدنی بدون منگنز برای هر کیلوگرم جیره پایه شامل: ۳۲۰۰۰ میلی‌گرم روی، ۳۲۰۰ میلی‌گرم مس، ۴۸۰ میلی‌گرم ید، ۸۸ میلی‌گرم سلنیوم، ۱۶۰۰۰ میلی‌گرم آهن.

*Vitamin premix provided per kg of diet: 3,200,000 IU/kg vitamin A, 1,320,000 IU/kg vitamin D3, 8,000 IU/kg vitamin E, 1,000 mg/kg vitamin K3, 1,000 mg/kg vitamin B1, 2,200 mg/kg vitamin B2, 3,200 mg/kg vitamin C, 12,000 mg/kg niacin, 1600 mg/kg of B6, 360 mg/kg of B9, 9 mg/kg of B12, 30 mg/kg of biotin, 44,000 mg/kg of choline, 3,000 mg/kg antioxidant.

**Mineral premix provided per kg of diet: 32,000 mg zinc, 3,200 mg copper, 480 mg iodine, 88 mg selenium, 16,000 mg iron.

۱-۲- آماده‌سازی آب آشامیدنی

برای آب مصرفی در تیمارهایی با شوری پایین (کمتر از ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر) از آب شهری و برای آماده‌سازی آب مصرفی مورد نیاز جهت تیمارها با مقدار شوری بالا، بر اساس اطلاعات سایت مدیریت منابع آب ایران و سایر منابع اطلاعاتی مرتبط با کیفیت آب مرغداری‌های شهرستان کاشمر از چاه‌های دارای شوری بالا استفاده شد. شناسایی و سپس مقدار شوری آن با دستگاه اتمیک یا جذب اتمی به‌طور دقیق تعیین گردید. آنالیز آب مصرفی در جدول ۲ گزارش شده است [13].

جدول ۲- آنالیز ترکیبات شیمیایی موجود در آب.

Table 2- Analysis of chemical compounds in water

Chemical Compounds	Minimum	Maximum	Mean
Arsenic (ppm)	0.80	8.60	-
Cadmium acetate (ppm)	5.10	50.00	-
Pb (ppm)	6.70	67.00	-
Benzene (ppm)	1.30	13.00	-
Trichloroethylene (ppm)	0.65	60.50	-
TDS (PPM)	<500	7912.00	2014.60
Na (meq / L)	2.69	2921.00	358.30
Cl (meq / L)	5/70	4042.00	661.00
K (meq / L)	0.39	966.00	10.00
SO4 (meq / L)	4.51	5028	407.60
Nitrate (mg /L)	0.0009	0.018	27.90
Nitrite (mg /L)	5.00	91.70	0.0024
pH	6.95	8.50	7.84

۲-۲- پارامترهای اندازه‌گیری شده

افزایش وزن

به‌منظور بررسی تغییرات وزن پرندگان مورد آزمایش پیش از شروع و هم‌چنین در پایان آزمایش واحدهای آزمایشی وزن‌کشی به‌وسیله ترازو با دقت یک گرم صورت گرفت.

خوراک مصرفی

خوراک مصرفی هر واحد آزمایشی، بعد از وزن شدن به ظرف مشخص شده اضافه و سپس روزانه در دو نوبت در روز به دان خوری هر واحد ریخته شد؛ به طوری که در وعده بعد به مقدار ۱۰٪ خوراک وارد شده در دان خوری خوراک باقی مانده باشد. در پایان هر دوره ۷ روزه بعد از جمع آوری خوراک از دان خوری، از تفاضل وزن خوراک باقی مانده از خوراک وارد شده مقدار خوراک مصرفی به دست آمد.

ضریب تبدیل خوراک

ضریب تبدیل خوراک با استفاده از تقسیم میانگین مصرف خوراک به میانگین افزایش وزن مرغ‌ها محاسبه شد.

$$۱-۲-۲-۲-۱ \text{ کمیت و کیفیت تخم مرغ تولیدی}$$

تعداد تخم مرغ

در پایان هر روز، تمامی تخم مرغ‌های مربوط به هر قفس شمارش و ثبت می‌شد.

وزن تخم مرغ

ابتدا تخم مرغ‌ها به کمک ترازو با دقت ۰/۰۰۱ گرم، وزن‌کشی شدند. بعد از آن، یک توری به کمک حداقل مفتول مسی، ساخته و به وسیله قلاب به حلقه زیر ترازو متصل شد. سپس تخم مرغ در درون توری در داخل بشر مدرج غوطه‌ور شده، سپس وزن در آب تخم مرغ (به جز وزن توری) ثبت شد. قابل ذکر است که در درون بشر آب مقطر ریخته و دقت به عمل می‌آید که در تمام طول آزمایش به یک مقدار و تعویض باشد هم‌چنین باید توجه داشت که دمای اتاق و آب در تمامی مراحل اندازه‌گیری ثابت باشد. سپس با فرمول زیر جرم مخصوص اندازه‌گیری شد [14].

$$(۱) \quad \text{وزن تخم مرغ در آب} - \text{وزن تخم مرغ در هوا} = \text{وزن ویژه}$$

وزن اجزای تخم مرغ (زرده، سفیده و پوسته)

در انتهای آزمایش، ۳ تخم مرغ از هر واحد آزمایشی به صورت تصادفی انتخاب و بعد از اندازه‌گیری شاخص شکل تخم مرغ‌ها (با استفاده از کولیس)، وزن زرده، سفیده و پوسته اندازه‌گیری شد. زرده و سفیده به وسیله قاشقک مخصوص زرده (کروی) از یکدیگر جدا شدند و آلبومین اضافی تا حد امکان از سطح زرده گرفته شد. وزن پوسته تخم مرغ اندازه‌گیری شد. از اختلاف وزن کل تخم مرغ و کل وزن زرده و پوسته، وزن سفیده ثبت گردید [15].

شاخص‌ها

برای اندازه‌گیری واحدها و از دستگاه Tester Multi E (EMT-520) استفاده شد. درواقع شاخصی است که در آن ارتفاع سفیده برای وزن تخم مرغ تصحیح شده است. تصحیح از طریق رابطه لگاریتمی زیر انجام می‌شود.

$$(۲) \quad HU = 100 \log(h + 7.57 - 1.7 g 0.37).$$

در این فرمول H عبارت است از ارتفاع سفیده غلیظ بر حسب میلی‌متر و g عبارت از وزن تخم مرغ بر حسب گرم [16].

ضخامت پوسته و شاخص شکل تخم مرغ

برای اندازه‌گیری ضخامت پوسته، ابتدا محتویات تخم مرغ خالی و داخل پوسته تخم مرغ‌های مورد نظر با دستمال کاغذی از بقایای سفیده پاک گردید. پوسته‌های جمع‌آوری شده شماره‌گذاری و در دمای اتاق قرار داده شدند تا کاملاً خشک شوند. ضخامت پوسته در سه نقطه (بالا، وسط و

انتها) توسط میکرومتر (OSK13469) اندازه گرفته شد و میانگین این سه نقطه به عنوان ضخامت کل پوسته بیان گردیدند. برای اندازه‌گیری شاخص شکل تخم مرغ، با استفاده از کولیس با دقت ۰/۱ سانتی متر طول و عرض کلیه تخم مرغ‌های جمع‌آوری شده برحسب سانتی متر اندازه‌گیری و شاخص شکل تخم مرغ به صورت زیر محاسبه شد [14].

$$(3) \quad \text{شاخص شکل تخم مرغ} = \frac{\text{عرض تخم مرغ (متر سانتی)}}{\text{طول تخم مرغ (متر سانتی)}} \times 100.$$

مقادیر مواد معدنی و فلزات سنگین در تخم مرغ

غلظت مواد معدنی و عناصر سنگین از هر نمونه با استفاده از دستگاه اسپکترومتری اندازه‌گیری شد [14].

۳-۲- شاخص‌های بیوشیمیایی خون

در انتهای دوره آزمایش، پس از اعمال ۴ ساعت گرسنگی برای مرغ‌های مورد آزمایش، از هر تکرار، ۲ قطعه پرنده به صورت تصادفی انتخاب و خون‌گیری از ورید بال انجام شد. سرم خون یکی از نمونه‌ها در داخل سانتریفیوژ با دور ۵۰۰۰ در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه جدا شده و تا زمان انجام آزمایش، در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. متابولیک‌های خون (گلوکز، ازت اوره‌ای خون، کراتینین، کلسترول، تری‌گلیسیرید، پروتئین کل)، الکترولیت‌های خون (فسفر پتاسیم، منیزیم، سدیم، کلسیم، کلر)، هورمون‌ها (انسولین و آلدوسترون و کورتکوسترون)، آنزیم‌های کبدی (آلانین آمینوترانسفراز و آسپاراتات آمینوترانسفراز) مورد ارزیابی قرار گرفت [17].

۴-۲- سیستم ایمنی هومورال

از روش سنجش مستقیم هموآگلوتیناسیون، برای اندازه‌گرفتن پاسخ ایمنی (آنتی‌بادی تولیدشده) علیه گلبول‌های قرمز گوسفندی (SRBC) در شرایط استریل استفاده شد. به این صورت که از یک راس قوچ مقدار ۲۰۰ میلی‌لیتر خون گرفته شد و از انعقاد آن جلوگیری به عمل آمد. سپس مقدار ۱۰ میلی‌لیتر خون گوسفندی، با رعایت شرایط استریل داخل فالكون‌های استریل ریخته شد و به مدت ۵ دقیقه با دور ۳۰۰۰-۲۵۰۰ سانتریفیوژ گردید. سپس مایع رویی جدا و رسوب گلبولی با بافر فسفات (PBS) مخلوط گردید و مجدداً سانتریفیوژ شد. تا گلبول‌های قرمز کاملاً شسته و مایع رویی کاملاً شفاف شود این عمل انجام شد سپس گلبول‌های قرمز با محلول بافر نمکی فسفات به نسبت ۱۰٪ (۱۰ میلی‌لیتر گلبول قرمز و ۹۰ میلی‌لیتر محلول بافر نمکی فسفات) رقیق شد. بعد از آن دو قطعه پرنده به صورت کاملاً تصادفی انتخاب شدند و تزریق انجام گرفت و از اولین ۲ هفته دوره تولید و متعاقب آن ۱۵ روز پس از تزریق از بال تیتراژ آنتی‌بادی علیه بیماری نیوکاسل از همان مرغ‌ها خون‌گیری به عمل آمد و برای تعیین تیتراژ آنتی‌بادی علیه SRBC، تیتراژ آنتی‌بادی علیه نیوکاسل، ایمنوگلوبولین (IGM) مورد بررسی قرار گرفتند [18].

۵-۲- تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار آماری نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۱ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. مقایسات میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی در سطح ۵٪ انجام شد.

۶-۲- نتایج

۱-۶-۲- عملکرد

نتایج حاصل از اثر غلظت مواد شیمیایی و محدودیت ۵۰٪ در آب آشامیدنی بر عملکرد تولیدی مرغ‌های تخم‌گذار از سن ۳۴ تا ۳۷ هفتگی در جدول ۳ گزارش شده است. با توجه به نتایج، درصد تخم‌گذاری، تخم‌مرغ تولیدی روزانه، مصرف خوراک، ضریب تبدیل خوراک و آب مصرفی به طور معنی‌داری تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار گرفتند ($P < 0.05$) اما میانگین وزن تخم‌مرغ تحت تاثیر قرار نگرفت ($P > 0.05$). بیش‌ترین درصد تخم‌گذاری، تخم‌مرغ تولیدی روزانه، مصرف خوراک و آب مصرفی و کم‌ترین ضریب تبدیل خوراک در تیمار شاهد نسبت به سایر تیمارهای

آزمایشی مشاهده شد. هم‌چنین تفاوت تیمارهای با غلظت کم و بالای مواد شیمیایی بر تخم‌مرغ تولیدی روزانه (egg mass) معنی‌دار بود ($P < 0.05$).

جدول ۳- بررسی اثر غلظت مواد شیمیایی و محدودیت ۵۰٪ در آب آشامیدنی بر عملکرد تولیدی در سن ۳۴ تا ۳۷ هفتگی.

Table 3- Investigating the effect of chemical concentration and 50% limit in drinking water on production performance.

Treatments	Hen day production (%)	Egg weight (gr)	Egg mass (gr)	Feed Intake (gr)	Conversion factor	Water Intake (M Lit/day)
Treatment1	90.93 ^a	59.76	54.38 ^a	92.71 ^a	1.70 ^b	206.16 ^a
Treatment2	84.79 ^{ab}	59.03	50.00 ^b	92.35 ^{ab}	1.84 ^{ab}	200.57 ^b
Treatment3	84.78 ^{ab}	58.67	47.60 ^c	86.18 ^b	1.82 ^{ab}	174.52 ^c
Treatment4	83.99 ^{ab}	58.80	50.71 ^b	92.46 ^{ab}	1.82 ^{ab}	202.35 ^a
Treatment5	84.629 ^b	56.23	45.13 ^c	90.43 ^{ab}	2.00 ^a	167.82 ^c
P-Value	0.038	0.65	0.002	0.031	0.023	0.0002
SEM	2.30	1.68	1.34	1.46	0.05	5.15

حروف کوچک بالای هر ستون اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد ($P < 0.05$). تیمار ۱ (شاهد): مرغ‌ها با دسترسی آزاد به آب آشامیدنی، تیمار ۲: دسترسی آزاد به آب با غلظت کم مواد شیمیایی (در طول روز)، تیمار ۳: دسترسی آزاد به آب با غلظت بالای مواد شیمیایی (در طول روز)، تیمار ۴: دسترسی به آب با غلظت پایین مواد شیمیایی و محدودیت ۵۰٪ در آب مصرفی روزانه (هر شبانه‌روز) و تیمار ۵: دسترسی به آب با غلظت بالای مواد شیمیایی و محدودیت ۵۰٪ در آب مصرفی روزانه (هر شبانه‌روز).

۲-۶-۲- اجزای تخم‌مرغ

بررسی اثر غلظت مواد شیمیایی و محدودیت ۵۰٪ در آب آشامیدنی بر وزن اجزای تخم‌مرغ در جدول ۴ گزارش شده است. نتایج نشان داد، وزن زرده در سن ۳۷ هفتگی تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت ($P > 0.05$)؛ اما وزن سفیده و پوسته به‌طور معنی‌داری در سن ۳۷ هفتگی تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار گرفت ($P < 0.05$). به‌طوری‌که بیش‌ترین وزن سفیده در تیمارهای ۱ (شاهد) و ۲ (غلظت کم مواد شیمیایی) و کم‌ترین آن در تیمار ۵ (غلظت بالای مواد شیمیایی و محدودیت ۵۰٪ در آب مصرفی روزانه) مشاهده شد. هم‌چنین وزن پوسته بیش‌ترین را تیمار شاهد و کم‌ترین آن را تیمار ۳ (غلظت بالای مواد شیمیایی) به خود اختصاص داد و با سایر تیمارهای آزمایشی تفاوت معنی‌داری داشت ($P < 0.05$).

جدول ۴- بررسی اثر غلظت مواد شیمیایی و محدودیت ۵۰٪ در آب آشامیدنی بر وزن اجزای تخم‌مرغ در ۳۷ هفتگی.

Table 4- Investigating the effect of chemical concentration and 50% limit in drinking water on the weight of egg components at 37 weeks.

Treatments	Shell Weight (gr)	White Weight (gr)	Yolk (gr)
Treatment1	5.96 ^a	42.19 ^a	15.72
Treatment2	5.36 ^a	42.36 ^a	15.18
Treatment3	4.41 ^b	38.35 ^{ab}	15.39
Treatment4	5.74 ^a	41.00 ^{ab}	15.12
Treatment5	5.59 ^a	37.52 ^b	15.43
P-Value	0.0003	0.0006	0.50
SEM	0.30	0.73	0.26

حروف کوچک بالای هر ستون اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد ($P < 0.05$). تیمار ۱ (شاهد): مرغ‌ها با دسترسی آزاد به آب آشامیدنی، تیمار ۲: دسترسی آزاد به آب با غلظت کم مواد شیمیایی (در طول روز)، تیمار ۳: دسترسی آزاد به آب با غلظت بالای مواد شیمیایی (در طول روز)، تیمار ۴: دسترسی به آب با غلظت پایین مواد شیمیایی و محدودیت ۵۰٪ در آب مصرفی روزانه (هر شبانه‌روز)، تیمار ۵: دسترسی به آب با غلظت بالای مواد شیمیایی و محدودیت ۵۰٪ در آب مصرفی روزانه (هر شبانه‌روز).

۲-۶-۳- کیفیت تخم‌مرغ

بررسی اثر غلظت مواد شیمیایی و محدودیت ۵۰٪ در آب آشامیدنی بر وزن شاخص کیفیت تخم‌مرغ در جدول ۵ گزارش شده است. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده، واحدها و تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت ($P > 0.05$)؛ اما وزن ویژه، شاخص شکل و ضخامت پوسته به‌طور معنی‌داری تحت تاثیر قرار گرفت ($P < 0.05$). به‌طوری‌که بیش‌ترین وزن ویژه در تیمار ۱ و کم‌ترین آن در تیمار ۵ مشاهده شد هم‌چنین شاخص شکل در تیمار ۵ نسبت به سایر تیمارهای دیگر بیش‌ترین مقدار را به خود اختصاص داد بعلاوه ضخامت پوسته در تیمار ۲ بیش‌ترین و در تیمار ۵ کم‌ترین بود.

جدول ۵- بررسی اثر غلظت مواد شیمیایی و محدودیت ۵۰٪ در آب آشامیدنی بر کیفیت تخم‌مرغ در ۳۷ هفتگی.

Table 5- Investigating the effect of chemical concentration and 50% limit in drinking water on egg quality at 37 weeks.

Treatments	Shell Thickness (Micro Meter)	Shape Index	Haught Unit	Specific Gravity
Treatment1	0.446 ^{ab}	77.42 ^b	87.52	1.087 ^a
Treatment2	0.448 ^a	77.32 ^b	86.70	1.086 ^{ab}
Treatment3	0.398 ^{ab}	78.92 ^{ab}	85.68	1.082 ^{ab}
Treatment4	0.425 ^{ab}	78.31 ^{ab}	86.85	1.083 ^{ab}
Treatment5	0.351 ^b	81.17 ^a	84.32	1.077 ^b
P-Value	0.035	0.01	0.75	0.034
SEM	0.021	0.74	1.80	0.002

حروف کوچک بالای هر ستون اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد ($P < 0.05$). تیمار ۱ (شاهد): مرغ‌ها با دسترسی آزاد به آب آشامیدنی، تیمار ۲: دسترسی آزاد به آب با غلظت کم مواد شیمیایی (در طول روز)، تیمار ۳: دسترسی آزاد به آب با غلظت بالای مواد شیمیایی (در طول روز)، تیمار ۴: دسترسی به آب با غلظت پایین مواد شیمیایی و محدودیت ۵۰٪ در آب مصرفی روزانه (هر شبانه‌روز)، تیمار ۵: دسترسی به آب با غلظت پایین مواد شیمیایی و محدودیت ۵۰٪ در آب مصرفی روزانه (هر شبانه‌روز).

۴-۶-۲- شاخص‌های بیوشیمیایی خون

بررسی اثر غلظت مواد شیمیایی و محدودیت ۵۰٪ در آب آشامیدنی بر فاکتورهای خونی در جدول ۶ آورده شده است. با توجه به نتایج، پروتئین کل، گلوکز، تری‌گلیسیرید و کلسترول به‌طور معنی‌داری تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفتند ($P > 0.05$). ولی مقدار اوریک اسید و کراتینین به‌طور معنی‌داری تحت تاثیر غلظت مواد شیمیایی و محدودیت ۵۰٪ در آب آشامیدنی قرار گرفتند ($P < 0.05$). به‌طوری‌که کم‌ترین مقدار اسید اوریک و کراتینین را تیمار شاهد و بیش‌ترین آن‌ها را تیمار ۳، ۴ و ۵ به خود اختصاص دادند.

جدول ۵- بررسی اثر غلظت مواد شیمیایی و محدودیت ۵۰٪ در آب آشامیدنی بر فاکتورهای خونی.

Table 6- Investigating the effect of chemical concentration and 50% limit in drinking water on blood factors.

Treatments	Total Protein (g/dl)	Glucose (mg/dl)	Uric Acid (mg/dl)	Creatinine (mg/dl)	Triglycerides (mg/dl)	Cholesterol (mg/dl)
Treatment1	5.35	146.62	2.95 ^b	0.43 ^b	166.22	142.57
Treatment2	5.02	146.15	3.82 ^{ab}	0.47 ^b	163.37	145.3
Treatment3	4.50	153.75	5.02 ^a	0.65 ^a	171.67	150.10
Treatment4	4.85	147.40	5.22 ^a	0.70 ^a	171.22	150.62
Treatment5	3.97	152.9	5.32 ^a	0.70 ^a	172.32	151.82
P-Value	0.47	0.50	0.001	0.0008	0.54	0.19
SEM	0.55	3.91	0.36	0.04	4.42	3.00

حروف کوچک بالای هر ستون اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد ($P < 0.05$). تیمار ۱ (شاهد): مرغ‌ها با دسترسی آزاد به آب آشامیدنی، تیمار ۲: دسترسی آزاد به آب با غلظت کم مواد شیمیایی (در طول روز)، تیمار ۳: دسترسی آزاد به آب با غلظت بالای مواد شیمیایی (در طول روز)، تیمار ۴: دسترسی به آب با غلظت پایین مواد شیمیایی و محدودیت ۵۰٪ در آب مصرفی روزانه (هر شبانه‌روز)، تیمار ۵: دسترسی به آب با غلظت بالای مواد شیمیایی و محدودیت ۵۰٪ در آب مصرفی روزانه (هر شبانه‌روز).

۵-۶-۲- هورمون‌ها و آنزیم‌های کبدی

بررسی اثر غلظت مواد شیمیایی و محدودیت ۵۰٪ در آب آشامیدنی بر هورمون‌ها و آنزیم‌های کبدی در جدول ۷ آورده شده است. نتایج این جدول نشان داد، کورتیکوسترون و آنزیم آسپاراتات آمینوترانسفراز تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفتند ($P > 0.05$). ولی هورمون انسولین و آنزیم آلانین آمینوترانسفراز به‌طور معنی‌داری تحت تاثیر اثر غلظت مواد شیمیایی و محدودیت ۵۰٪ در آب آشامیدنی قرار گرفتند ($P < 0.05$). به‌طوری‌که بیش‌ترین مقدار انسولین در تیمار ۱ (شاهد) و کم‌ترین آن در تیمار ۵ (غلظت بالای مواد شیمیایی و محدودیت ۵۰٪ در آب مصرفی روزانه) مشاهده شد و هم‌چنین بیش‌ترین مقدار آنزیم آلانین آمینوترانسفراز در تیمار ۲ (غلظت کم مواد شیمیایی) و کم‌ترین آن را تیمار ۵ به خود اختصاص داد.

جدول ۷- بررسی اثر غلظت مواد شیمیایی و محدودیت ۵۰٪ در آب آشامیدنی بر هورمون‌ها و آنزیم‌های کبدی.

Table 7- Investigating the effect of chemical concentration and 50% limit in drinking water on hormones and liver enzymes.

Treatment1	Hormones		Liver Enzymes	
	Insulin (ng/mL)	Chorticho Estriol (ng/mL)	Alanine Amino Transferase (U/L)	Asparatate Amino Transferase (U/L)
Treatment2	34.8 ^a	14.56	20.53 ^{ab}	159.50
Treatment3	33.84 ^{ab}	14.99	21.37 ^a	156.45
Treatment4	32.70 ^{ab}	14.67	19.12 ^{ab}	157.30
Treatment5	32.85 ^{ab}	14.80	19.10 ^{ab}	154.26
Treatments	31.47 ^b	14.21	18.13 ^b	147.76
P-Value	0.02	0.48	0.01	0.12
SEM	0.65	0.30	0.12	3.04

حروف کوچک بالای هر ستون اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد ($P < 0.05$). تیمار ۱ (شاهد): مرغ‌ها با دسترسی آزاد به آب آشامیدنی، تیمار ۲: دسترسی آزاد به آب با غلظت کم مواد شیمیایی (در طول روز)، تیمار ۳: دسترسی آزاد به آب با غلظت بالای مواد شیمیایی (در طول روز)، تیمار ۴: دسترسی به آب با غلظت پایین مواد شیمیایی و محدودیت ۵۰٪ در آب مصرفی روزانه (هر شبانه‌روز)، تیمار ۵: دسترسی به آب با غلظت بالای مواد شیمیایی و محدودیت ۵۰٪ در آب مصرفی روزانه (هر شبانه‌روز).

۶-۶-۲- عناصر معدنی خون

بررسی اثر غلظت مواد شیمیایی و محدودیت ۵۰٪ در آب آشامیدنی بر عناصر معدنی در خون در جدول ۸ گزارش شده است. غلظت مواد شیمیایی در آب آشامیدنی و محدودیت ۵۰٪ آب تأثیر معنی‌داری بر شاخص فسفر، پتاسیم، سدیم، کلسیم و کلسترول خون نداشت ($P > 0.05$).

جدول ۸- بررسی اثر غلظت مواد شیمیایی و محدودیت ۵۰٪ در آب آشامیدنی بر عناصر معدنی در خون.

Table 8- Investigating the effect of chemical substance concentration and 50% limit in drinking water on mineral elements in blood.

Treatments	(mmol/L) P	(mmol/L) K	(mmol/L) Na	(mmol/L) Cl	(mmol/L) Ca
Treatment1	1.72	4.48	157.35	137.20	5.09
Treatment2	1.83	4.51	157.79	132.28	4.80
Treatment3	1.24	4.72	161.35	139.45	5.87
Treatment4	1.47	4.72	160.28	137.76	5.17
Treatment5	1.46	4.50	161.35	138.57	5.54
P-Value	0.37	0.91	0.59	0.36	0.10
SEM	0.21	0.28	2.27	2.60	0.27

حروف کوچک بالای هر ستون اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد ($P < 0.05$). تیمار ۱ (شاهد): مرغ‌ها با دسترسی آزاد به آب آشامیدنی، تیمار ۲: دسترسی آزاد به آب با غلظت کم مواد شیمیایی (در طول روز)، تیمار ۳: دسترسی آزاد به آب با غلظت بالای مواد شیمیایی (در طول روز)، تیمار ۴: دسترسی به آب با غلظت پایین مواد شیمیایی و محدودیت ۵۰٪ در آب مصرفی روزانه (هر شبانه‌روز)، تیمار ۵: دسترسی به آب با غلظت بالای مواد شیمیایی و محدودیت ۵۰٪ در آب مصرفی روزانه (هر شبانه‌روز).

۶-۶-۷- هماتولوژی و سیستم ایمنی

بررسی اثر غلظت مواد شیمیایی و محدودیت ۵۰٪ در آب آشامیدنی بر فاکتورهای هماتولوژی خون در جدول ۹ گزارش شده است. نتایج نشان داد، تعداد گلبول‌های سفید خون، تعداد گلبول‌های قرمز خون، هموگلوبین و هماتوکریت خون به‌طور معنی‌دار تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفتند ($P > 0.05$).

جدول ۹- بررسی اثر غلظت مواد شیمیایی و محدودیت ۵۰٪ در آب آشامیدنی بر فاکتورهای هماتولوژی خون.

Table 9- Investigating the effect of chemical substance concentration and 50% limit in drinking water on blood hematology factors.

Treatments	White Blood Cell Count ($\text{mm}^3/\mu\text{l} \times 10^9$)	Red Blood Cell Count ($\text{mm}^3/\mu\text{l} \times 10^9$)	Hemoglobin (g/l)	Hemato Crit (%)
Treatment1	5.99	2.55	133.55	31.14
Treatment2	5.94	1.85	130.35	30.07
Treatment3	4.97	1.90	136.06	29.32
Treatment4	5.67	1.76	126.04	25.47
Treatment5	4.46	1.60	123.84	25.00
P-Value	0.27	0.47	0.69	0.22
SEM	0.56	0.37	6.77	2.19

حروف کوچک بالای هر ستون اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد ($P < 0.05$). تیمار ۱ (شاهد): مرغ‌ها با دسترسی آزاد به آب آشامیدنی، تیمار ۲: دسترسی آزاد به آب با غلظت کم مواد شیمیایی (در طول روز)، تیمار ۳: دسترسی آزاد به آب با غلظت بالای مواد شیمیایی (در طول روز)، تیمار ۴: دسترسی به آب با غلظت پایین مواد شیمیایی و محدودیت ۵۰٪ در آب مصرفی روزانه (هر شبانه‌روز)، تیمار ۵: دسترسی به آب با غلظت بالای مواد شیمیایی و محدودیت ۵۰٪ در آب مصرفی روزانه (هر شبانه‌روز).

۷-۲- بحث

بیش‌ترین درصد تخم‌گذاری، تخم‌مرغ تولیدی روزانه، مصرف خوراک و آب مصرفی و کم‌ترین ضریب تبدیل خوراک در تیمار شاهد در مقایسه با تیمارهای حاوی غلظت کم و بالای مواد شیمیایی مشاهده شد. هم‌چنین تفاوت تیمارهای با غلظت کم و بالای مواد شیمیایی بر تخم‌مرغ تولیدی روزانه (egg mass) معنی‌دار بود ($P < 0.05$). در مطالعات گذشته نیز؛ پرندگانی که آب شور مصرف کردند، ضریب تبدیل خوراک بالاتری دارند و مصرف آب نیز در تیمارهایی با شوری بیشتر، به‌طور قابل‌توجهی افزایش می‌یابد [19]. تولید تخم‌مرغ تحت تاثیر ۴۰۰ ppm کلرید سدیم اضافه‌شده قرار نمی‌گیرد [20]. هم‌چنین با بررسی اثر غلظت بالای نمک (تا ۶۰۰ ppm) در آب روی مرغ‌های ۶۰ هفته‌ای، گزارش شده است که مصرف خوراک روزانه، تولید تخم‌مرغ و وزن تخم‌مرغ در طول ۵ هفته تحت تاثیر شوری آب قرار نمی‌گیرد [21]. در مطالعات دیگری نیز مصرف خوراک، تولید تخم‌مرغ، وزن تخم‌مرغ یا ضریب تبدیل خوراک تحت تاثیر شوری قرار نگرفتند [22]؛ اما بسیاری از محققان اثر نامطلوب نوشیدن آب شور چاه را بر عملکرد تولید گزارش کردند [4، 23]. هم‌چنین استفاده از مکمل آرسنیک در جیره غذایی به‌طور قابل‌توجهی باعث کاهش عملکرد تخم‌گذاری از جمله تولید تخم‌مرغ و وزن تخم‌مرغ شد [24]. ممکن است این اختلاف در نتایج مطالعات مختلف به دلیل تفاوت در نوع پرند، شرایط محیطی و نحوه طراحی آزمایش باشد.

در این پژوهش تیمارهای آزمایشی تاثیری در وزن زرده نداشتند؛ مخالف با این نتیجه در مطالعه دیگری مصرف آب شور تاثیر معنی‌داری بر زرده تخم‌مرغ داشت [19]. بیش‌ترین وزن پوسته را تیمار شاهد و کم‌ترین آن را تیمار ۳ (غلظت بالای مواد شیمیایی) به خود اختصاص داد و با سایر تیمارهای آزمایشی تفاوت معنی‌داری داشت ($P < 0.05$). در آزمایش دیگری اثر قابل‌توجهی از ۲۰۰ ppm نمک در آب آشامیدنی بر وزن پوسته مشاهده نشد [22]. ارائه سطوح بالاتر نمک چه در آب آشامیدنی و چه در خوراک مرغ‌های تخم‌گذار، کلسیم پوسته را کاهش می‌دهد [25]. چندین مطالعه نشان داده‌اند که قرار گرفتن در معرض کادمیوم می‌تواند کیفیت پوسته تخم‌مرغ را کاهش دهد [26]. ضخامت پوسته تخم‌مرغ با افزایش زمان قرار گرفتن در معرض فلزات سنگین (کادمیوم) کاهش پیدا می‌کند و هم‌چنین غنی‌سازی کلسیم در تخمدان‌ها را نیز کاهش می‌دهد [27] و سبب تضعیف لوله‌های فالوپ و سایر به‌بافت‌ها می‌شود [8]. در نتیجه رسوب کلسیم را کاهش می‌دهد و کیفیت تخم‌مرغ را تحت تاثیر قرار می‌دهد. آلودگی جیره با ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم کادمیوم، ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سرب، ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم جیوه و ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم کروم تاثیر منفی بر کیفیت تخم‌مرغ‌ها در اواخر دوره تخم‌گذاری دارد [28]. فلزات سنگین سمی می‌توانند بر اندام‌های تولیدمثل و ضخامت پوسته تخم‌مرغ و... تاثیر گذارند [29]. این موارد می‌توانند دلیلی برای کاهش وزن پوسته در این مطالعه باشد.

مطابق با نتایج این آزمایش نشان داده شد که گلوکز کل در پرندگانی که آب شور چاه مصرف کردند در مقایسه با آن‌هایی که آب شهری مصرف کرده بودند کاهش معنی‌داری پیدا کرد. در پژوهشی دیگر مصرف آب شور چاه سبب کاهش غلظت پروتئین و کلسترول شده است و مشخص شد که پروتئین کل به‌طور قابل‌توجهی در مرغ‌هایی که آب شور مصرف کردند در مقایسه با مرغ‌هایی که آب شهری مصرف کردند کاهش یافته است [19]. ممکن است به این دلیل که نوشیدن آب چاه شور منجر به قرار گرفتن بدن در معرض استرس متابولیک و افزایش نیاز به انرژی برای حفظ تعادل سدیم/پتاسیم می‌شود سبب کاهش غلظت گلوکز خون شود [9، 30]. در آزمایشی که بر روی مرغ‌های تخم‌گذار نژاد هایلاین سفید انجام شد، استفاده از مکمل آرسنیک سبب تغییر معنی‌داری بر پروتئین کل، آلبومین و کراتینین نشد اما به‌طور معنی‌داری سبب افزایش نیتروژن اوره خون و

اسیداوریک شد [24]. در این مطالعه پرنده‌گانی که از آب حاوی ترکیبات شیمیایی استفاده کرده بودند در مقایسه با گروه شاهد دارای سطوح کراتینین و اسید اوریک خون بودند. در یک بررسی، مطابق با نتایج مطالعه حاضر، افزایش کراتینین سرم و اسید اوریک هنگامی که حیوان با غلظت‌های بالای روی (غلظت سمی) تغذیه شدند، مشاهده شد [31].

در مطالعه حاضر آنزیم آسپارات آمینوترانسفراز تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت اما نتایج مربوط به آنزیم آلانین آمینوترانسفراز نشانه دهنده اختلاف معنی‌دار تیمار شاهد با تیمار ۵ بود. در گزارش‌های مختلفی مشخص شد که آنزیم آلانین آمینوترانسفراز و آسپارات آمینوترانسفراز در مرغ‌هایی که آب شور مصرف کردند نسبت به آب شهری به‌طور معنی‌داری افزایش یافت [19]. آزمایشانی که پرنده‌گان آب شور مصرف کرده‌اند ممکن است افزایش بار نمکی اثرات مضری بر عملکرد کبد و کلیه گذاشته باشد [10]، [19]. از طرفی این افزایش ممکن است منعکس‌کننده نارسایی کبد باشد که با کاهش آلبومین پلاسما پس از نوشیدن آب شور چاه و یا منعکس‌کننده ناکافی بودن فیلتراسیون گلومرولی کلیه و اختلال در کلیه باشد. ممکن است در تیمارهایی که شاهد سطوح بالای آنزیم‌های کبدی هستیم تا حدی آسیب کبدی در پرنده‌گان القا شده باشد [32].

در این آزمایش عناصر معدنی خون تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفتند. در بررسی مطالعات مشابه مشخص گردید که کیفیت آب آشامیدنی تاثیری بر سدیم، فسفر، پتاسیم خون ندارد [33]. در پژوهشی دیگر که نتایجی مخالف با نتایج مطالعه حاضر داشت مشخص گردید مقدار کلسیم و سدیم در مرغ‌هایی که آب شور چاه مصرف کردند نسبت به مرغ‌های که آب شهری مصرف نمودند افزایش یافته است؛ در مقابل، سطح پتاسیم در گروهی که آب شور چاه مصرف کردند کاهش یافت [19]. مواد معدنی موجود در مایعات و بافت‌های بدن به‌عنوان الکترولیت‌ها، با حفظ فشار اسمزی، تعادل اسید و باز، نفوذپذیری غشا و تحریک‌پذیری بافت هشدار می‌دهند [33]؛ بنابراین، سطوح بالاتر الکترولیت‌ها را می‌توان به این دلیل توضیح داد که مرغ‌هایی که آب حاوی سطوح بالای املاح و مواد شیمیایی می‌نوشند غلظت بیشتری از این مواد معدنی را دریافت می‌کنند و محتمل است که سطح بالای الکترولیت‌ها در آب آشامیدنی سبب افزایش سطح آن‌ها در سرم خون می‌شود [23].

پارامترهای خونی به‌عنوان شاخصی مهم برای پرنده‌گان سالم در نظر گرفته می‌شود، بنابراین پرنده‌گانی که آب شور چاه می‌نوشند ممکن است از تغییرات فیزیولوژیکی شدیدی، برای حفظ قوام و ثبات بدن رنج ببرند [23]. برخلاف نتایج این آزمایش، در مطالعه‌ای به‌منظور بررسی اثرات زئولیت جیره بر عملکرد مرغ‌های تخم‌گذار در آب آشامیدنی چاه شور انجام شد، مشخص شد تعداد گلبول‌های قرمز خون و غلظت هموگلوبین در مرغ‌های که آب چاه شور نوشیدن در مقایسه با سایر تیمارها کمتر بود و از سوی دیگر، حجم متوسط سلولی در آن‌ها افزایش یافت [19]. گلبول‌های قرمز و هموگلوبین خون مرغ‌های تخم‌گذار مورد آزمایش به‌طور معنی‌داری در تیماری که آب شور نوشیدند نسبت به مرغ‌هایی که آب شهری نوشیدند کاهش یافت، درحالی‌که تعداد گلبول‌های سفید به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است [19].

۳- نتیجه‌گیری

میانگین وزن تخم‌مرغ تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت. ولی درصد تخم‌گذاری، تخم‌مرغ تولیدی روزانه، مصرف خوراک، ضریب تبدیل خوراک و آب مصرفی در ۳۴ تا ۳۷ هفتگی به‌طور معنی‌داری تحت تاثیر غلظت مواد شیمیایی و محدودیت ۵۰٪ در آب آشامیدنی قرار گرفتند. تفاوت تیمارهای با غلظت کم و بالای مواد شیمیایی بر تخم‌مرغ تولیدی روزانه (egg mass) معنی‌دار بود. بیش‌ترین وزن سفیده در تیمارهای شاهد و غلظت کم مواد شیمیایی مشاهده شد. بیش‌ترین وزن پوسته را تیمار شاهد و کم‌ترین آن را تیمار ۳ (غلظت بالای مواد شیمیایی) به خود اختصاص داد. وزن مخصوص، شاخص شکل و ضخامت پوسته به‌طور معنی‌داری تحت تاثیر غلظت مواد شیمیایی و محدودیت ۵۰٪ در آب آشامیدنی قرار گرفت. غلظت مواد شیمیایی و محدودیت ۵۰٪ در آب آشامیدنی تاثیر معنی‌داری بر شاخص فسفر سرم خون، پتاسیم سرم خون، سدیم سرم خون، کلر سرم خون، کلسیم سرم خون، تعداد گلبول‌های سفید خون، تعداد گلبول‌های قرمز خون، هموگلوبین، هماتوکریت خون و هم‌چنین کادمیوم در زرده و سفیده، آرسنیک در زرده و سفیده و سرب در زرده و سفیده نداشت. بیش‌ترین مقدار انسولین در تیمار شاهد و کم‌ترین آن در غلظت بالای مواد شیمیایی و محدودیت ۵۰٪ در آب مصرفی روزانه مشاهده شد و هم‌چنین بیش‌ترین مقدار آنزیم آلانین آمینوترانسفراز در غلظت کم مواد شیمیایی و کم‌ترین آن را تیمار ۵ به خود اختصاص داد. کورتیکوستروئول و آسپارات آمینوترانسفراز تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفتند. به‌طورکلی وجود ترکیبات شیمیایی و عناصر سنگین در آب مورد استفاده طیور می‌تواند تا حدی سبب کاهش کیفیت تخم‌مرغ شود.

سپاسگزاری

از تمام عزیزانی که به نحوی ما را در انجام این پژوهش یاری نمودند؛ کمال تشکر را داریم.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچ تعارض منافی وجود ندارد.

منابع

- [1] Hoekstra, A. Y., & Chapagain, A. K. (2007). Water footprints of nations: water use by people as a function of their consumption pattern. *Integrated assessment of water resources and global change: a north-south analysis*, 21, 35–48. DOI:10.1007/978-1-4020-5591-1-3
- [2] Mahmoudlu, M. G., & Naseri, H. R. (2008). Investigation of salt water intrusion into sari aquifer. *Journal of environmental studies*, 34(47), 21–30. <https://www.magiran.com/paper/585471> LK - <https://www.magiran.com/paper/585471>
- [3] Schlink, A. C., Nguyen, M. L., & Viljoen, G. J. (2010). Water requirements for livestock production: a global perspective. *OIE revue scientifique et technique*, 29(3), 603–619. DOI:10.20506/rst.29.3.1999
- [4] Ahmed, M. M., & Abdel-Rahman, M. A. (2004). Effect of drinking natural saline groundwater on growth performance, behavior and some blood parameters in rabbits reared in new reclaimed lands of arid areas in assiut governorate Groundwater affects the growth rate, behavior, and some blood components in rabbits. *Assiut university bulletin for environmental researches*, 7.2(7.2), 125–136. DOI:10.21608/auber.2004.150738
- [5] Abdelsattar, M. M., Hussein, A. M. A., Abd El-Ati, M. N., & Saleem, A. M. (2020). Impacts of saline water stress on livestock production: a review. *SVU-international journal of agricultural sciences*, 2(1), 1–12. DOI:10.21608/svuijas.2020.67635
- [6] Habibur Rahman Jawhari, Mohammad Ayoub Hanif, & Farahuddin Larghani. (2022). Effect of different salt sizes on drinking water of broiler chickens on food consumption and body weight gain. *International journal for research in applied sciences and biotechnology*, 9(2), 290–297. DOI:10.31033/ijrasb.9.2.24
- [7] Fairchild, B. D., & Ritz, C. W. (2015). *Poultry drinking water primer*. UGA Extension. University of Georgia. <https://extension.uga.edu/publications/detail.html?number=B1301&title=poultry-drinking-water-primer>
- [8] Zhang, Y., Gao, W., & Meng, Q. (2007). Fermentation of plant cell walls by ruminal bacteria, protozoa and fungi and their interaction with fibre particle size. *Archives of animal nutrition*, 61(2), 114–125. DOI:10.1080/17450390701204020
- [9] Hassan, M. (2017). Semen quality and hematological parameters of sina cocks fed atripex nummularia leaves meal under desert conditions. *Egyptian poultry science journal*, 37(4), 1119–1133. DOI:10.21608/epsj.2017.5383
- [10] Morsy, A. S. (2018). Effect of zeolite (clinoptilolite) as a salinity stress alleviator on semen quality and hematobiochemical parameters of montazah cocks under south sinai conditions. *Research journal of animal and veterinary sciences*, 10(2), 9–17. DOI:10.22587/rjavs.2018.10.2.2
- [11] Yoselewitz, I., Zhang, D., & Balnave, D. (1990). The effect on egg shell quality of supplementing saline drinking water with sodium or ammonium bicarbonate. *Australian journal of agricultural research*, 41(6), 1187–1192. DOI:10.1071/AR9901187
- [12] Chapin, R. E., Phelps, J. L., Schwetz, B. A., & Yang, R. S. H. (1989). Toxicology studies of a chemical mixture of 25 groundwater contaminants: iii. male reproduction study in b6c3f1 mice. *Toxicological sciences*, 13(3), 388–398. DOI:10.1093/toxsci/13.3.388
- [13] Maulizar, A., Masykur, M., & Supardi, J. (2022). ANALISIS ph, tds, total hardness, alkalinity, dan silica pada boiler feet water di pt. socfindo perkebunan kelapa sawit di seunagan. *Jurnal mekanova: mekanikal, inovasi dan teknologi*, 8(1), 129. DOI:10.35308/jmkn.v8i1.5630
- [14] Arbabi-Motlagh, M. M., Ghasemi, H. A., Hajkhodadadi, I., & Ebrahimi, M. (2022). Effect of chelated source of additional zinc and selenium on performance, yolk fatty acid composition, and oxidative stability in laying hens fed with oxidised oil. *British poultry science*, 63(5), 680–690. DOI:10.1080/00071668.2022.2071596
- [15] Shafer, D. J., Carey, J. B., Prochaska, J. F., & Sams, A. R. (1998). Dietary methionine intake effects on egg component yield, composition, functionality, and texture profile analysis. *Poultry science*, 77(7), 1056–1062. DOI:10.1093/ps/77.7.1056
- [16] Tahami, Z., Dastar, B., Oskoueian, E., & Hashemi, S. R. (2021). Investigation of the effect of organic and inorganic selenium on the immune system, egg traits and blood parameters in laying hens. *Journal of animal environment*, 13(May 2020), 135–142. DOI:10.22034/aej.2021.136308
- [17] Şahan, Z., Kutay, H., & Çelik, L. (2021). Influence of effective microorganism supplementation to the drinking water on performance and some blood parameters of laying hens exposed to a high ambient temperature. *Revista brasileira de ciencia avicola / brazilian journal of poultry science*, 23(1), 1–6. DOI:10.1590/1806-9061-2020-1351
- [18] Allahdo, P., Ghodrati, J., Zarghi, H., Saadatfar, Z., Kermanshahi, H., & Edalatian Dovom, M. R. (2018). Effect of probiotic and vinegar on growth performance, meat yields, immune responses, and small intestine morphology of broiler chickens. *Italian journal of animal science*, 17(3), 675–685. DOI:10.1080/1828051X.2018.1424570

- [19] Emam, K. R. S., Toraih, H. M., Hassan, A. M., El-Far, A. A. E., Morsy, A. S., & Ahmed, N. A. E. H. (2019). Effect of zeolite dietary supplementation on physiological responses and production of laying hens drinking saline well water in south sinai. *Journal of world's poultry research*, 9(2), 109–122. DOI:10.36380/SCIL.2019.WVJ15
- [20] Krista, L. M., Carlson, C. W., & Olson, O. E. (1961). Some effects of saline waters on chicks, laying hens, poults, and ducklings. *Poultry science*, 40(4), 938–944. DOI:10.3382/ps.0400938
- [21] Yoselewitz, I., & Balnave, D. (1989). Egg shell quality responses of pullets given saline drinking water at different ages. *British poultry science*, 30(3), 715–718. DOI:10.1080/00071668908417195
- [22] Chen, J., & Balnave, D. (2001). The influence of drinking water containing sodium chloride on performance and eggshell quality of a modern, colored layer strain. *Poultry science*, 80(1), 91–94. DOI:10.1093/ps/80.1.91
- [23] Morsy, A. S., Hassan, M. M., & Hassan, M. (2012). Effect of natural saline drinking water on productive and physiological performance of. *Egyptian poultry science journal*, 32(32), 561–578. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:46914894>
- [24] Ma, Y., Shi, Y., Wu, Q., & Ma, W. (2021). Dietary arsenic supplementation induces oxidative stress by suppressing nuclear factor erythroid 2-related factor 2 in the livers and kidneys of laying hens. *Poultry science*, 100(2), 982–992. DOI:10.1016/j.psj.2020.11.061
- [25] Pourreza, J., Nili, N., & Edriss, M. A. (1994). Relationship of plasma calcium and phosphorus to the shell quality of laying hens receiving saline drinking water. *British poultry science*, 35(5), 755–762. DOI:10.1080/00071669408417740
- [26] Olgun, O. (2016). The effect of dietary essential oil mixture supplementation on performance, egg quality and bone characteristics in laying hens. *Annals of animal science*, 16(4), 1115–1125. DOI:10.1515/aoas-2016-0038
- [27] Li, J., Xing, L., & Zhang, R. (2018). Effects of se and cd co-treatment on the morphology, oxidative stress, and ion concentrations in the ovaries of laying hens. *Biological trace element research*, 183(1), 156–163. DOI:10.1007/s12011-017-1125-9
- [28] Li, L. (2020). Toxic effects of combined cadmium, lead, mercury, and chromium on laying hens and alleviation properties of selenium.
- [29] Dauwe, T., Janssens, E., Kempenaers, B., & Eens, M. (2004). The effect of heavy metal exposure on egg size, eggshell thickness and the number of spermatozoa in blue tit parus caeruleus eggs. *Environmental pollution*, 129(1), 125–129. DOI:10.1016/j.envpol.2003.09.028
- [30] Guyton, a C., & Holl, J. E. (1996). *Text book of medical physiology*. Elsevier. https://www.academia.edu/42776227/Physiology_11th_Edition_Guyton_and_Hall
- [31] Abdel-Tawwab, M., El-Sayed, G. O., & Shady, S. H. H. H. (2011). Acute toxicity of water-born zinc in nile tilapia, oreochromis niloticus (l.) fingerlings. In *Better science, better fish, better life* (pp. 44–50). AquaFish Collaborative Research Support Program.
- [32] Abdel-Rahman, A. M., Abou-Ashour, A. M., Abdou, F. H., El-Sherif, M. M. A., & Hassan, A. H. (2000). Effect of drinking natural saline water on some physiological aspects of california rabbits. *5th vet. med. zag. conference (12-14 sept. 2000)* (pp. 94–100). Sharm El-Sheikh.
- [33] Hassan, A. A., Hameed, M. S., & Al-Ezzy, A. I. A. (2020). Effect of drinking water quality on physiological blood parameters and performance of laying hens in diyala province, Iraq. *Biochemical and cellular archives*, 20(1), 2649–2654. DOI:10.35124/bca.2020.20.1.2649
- [34] Underwood, E. J., & Suttle, N. F. (1999). The mineral nutrition of livestock. In *the mineral nutrition of livestock*. CABI Publishing. DOI: 10.1079/9780851991283.0000

Paper Type: Original Article



Evaluation of the Effect of Growth Factor Activin A and Small Molecule IDE1 on Proliferation and Self-Renewal of Chicken Primordial Germ Cells in Vitro Culture

Masumeh Zare¹, Seyed Ziaedin Mirhoseini^{1*}, Seyedeh-Nafiseh Hassani², Shahrokh Ghovvati¹

¹Department of Animal Science, Faculty of Agricultural Science, University of Guilan, Rasht, Iran; PhD student, Zare.masum@gmail.com; szmirhoseini@gmail.com; Professor, szmirhoseini@gmail.com.

²Department of Stem Cells and Developmental Biology, Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran; Associate Professor: nafiseh.hassani@gmail.com.

Citation:

Zare, M., Mirhoseini, S. Z., Hassani, S. N., & Ghovvati, Sh. (2023). Evaluation of the effect of growth factor Activin A and small molecule IDE1 on proliferation and self-renewal of chicken primordial germ cells in vitro culture. *The quarterly scientific journal of applied biology*, 36(3), 63-79.

Received: 18/11/2023

Accepted: 12/06/2023

Abstract

Introduction: The main challenge of Primordial Germ Cells (PGC) is their lack of proliferation and self-renewal in the culture medium. One approach to induce proliferation in PGC cells is manipulating intracellular signaling pathways such as TGF- β . The use of growth factors and small molecules is one of the ways to achieve this goal.

Methods: Chicken gonadal PGC cells were cultured and incubated at 50,000 cells per well in a 24-well plate coated with Matrigel. The experimental groups included four groups: control (basic medium for PGCs culture), treatment with small molecule IDE1 (100 nM; Stemgent, USA, 04-0026), treatment with growth factor A Activin (25 ng/ml; R&D Systems, 338-AC), and treatment with SB431542 (10 μ M; Cayman Chemical, 13031) with three replicates from each group. To check the amount of cell proliferation, PGC cells were counted with a hemocytometer at intervals of 7, 14, and 21 days after treatment. The activity of the TGF/ β signaling pathway was evaluated by examining the expression of SMAD2, SMAD3, and LFTTY1 genes by qRT-PCR method.

Results: The effect of Activin A and IDE1 increased the proliferation of PGC cells to more than 4 times compared to the control group, while the SB431542 group decreased cell proliferation. Activin A and IDE1 experimental groups maintained cell viability and culture for 25 days but did not lead to long-term culture. Also, the results of investigating the activity of the TGF/ β signaling pathway showed that Activin A and IDE1 led to increased expression of Smad2, Smad3, and LFTTY1 genes compared to the control and SB431542 groups.

Conclusion: The results of this research represented that improving the culture conditions and activating the effective signaling pathways in pluripotency can induce pluripotency and long-term culture of chicken PGC cells.

Keywords: Pluripotency, Self-renewal, Primordial germ cells, Activin A, IDE1.



Corresponding Author: szmirhoseini@gmail.com



<https://doi.org/10.22051/jab.2023.42190.1523>



ارزیابی تاثیر فاکتور رشد Activin A و کوچک مولکول IDE1 در تکثیر و خودنوزایی سلول‌های زایای بدوی جوجه در شرایط کشت آزمایشگاهی

معصومه زارع^۱، سیدضیال‌الدین میرحسینی^{۱*}، سیده نفیسه حسینی^۲، شاهرخ قوتی^۱

^۱گروه علوم دامی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

^۲پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست‌شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات علوم سلولی،

گروه سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی، تهران، ایران.

چکیده

مقدمه: چالش اصلی سلول‌های زایای بدوی، عدم تکثیر و خودنوزایی آن‌ها در محیط کشت است. یک روش برای القای پرتوانی سلول‌های PGC، دست‌کاری مسیرهای پیام‌رسانی درون‌سلولی از جمله $TGF-\beta$ است که استفاده از فاکتورهای رشد و کوچک مولکول‌ها یکی از روش‌های رسیدن به این هدف است.

روش‌ها: سلول‌های PGC غدد جنسی جوجه با غلظت ۵۰۰۰۰ سلول به ازای هر خانه در پلیت ۲۴ خانه پوشش داده شده با ماتریزل و یا ژلاتین کشت و گرماگذاری شدند. گروه‌های آزمایشی شامل چهار گروه کنترل (محیط پایه برای کشت PGCs)، تیمار با کوچک مولکول IDE1^۱ (100 nM; Stemgent, USA, 04-0026)، تیمار با فاکتور رشد Activin A (25 ng/ml; R&D Systems, 338-AC) و تیمار با SB431542 (10 μ M; Cayman Chemical, 13031) با سه تکرار از هر گروه بودند. به منظور بررسی میزان تکثیر سلولی، شمارش سلول‌های PGC در بازه‌های زمانی ۷، ۱۴ و ۲۱ روز بعد از تیمار با هموسایتمتر انجام شد. فعالیت مسیر سیگنالینگ TGF/β با بررسی بیان ژن‌های SMAD3، SMAD2 و LFTTY1 با روش qRT-PCR^۲ ارزیابی شد.

یافته‌ها: تاثیر Activin A و IDE1 منجر به افزایش تکثیر سلول‌های PGCs به بیش از ۴ برابر در مقایسه با گروه کنترل گردید و در مقابل گروه SB431542 منجر به کاهش تکثیر سلولی شد. گروه‌های آزمایشی Activin A و IDE1 قادر به حفظ زنده‌مانی و کشت سلول‌ها به مدت زمان ۲۵ روز شدند، اما منجر به کشت طولانی مدت نگردید. هم‌چنین نتایج بررسی فعالیت مسیر سیگنالینگ TGF/β نشان داد که Activin A و IDE1 منجر به افزایش بیان ژن‌های Smad2، Smad3 و LFTTY1 در مقایسه با گروه‌های کنترل و SB431542 شدند.

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق بیان می‌دارد که بهبود شرایط کشت و فعال‌سازی مسیرهای پیام‌رسانی موثر در پرتوانی می‌تواند سبب القای پرتوانی و کشت طولانی مدت سلول‌های PGC جوجه شود.

کلیدواژه‌ها: پرتوانی، خودنوزایی، سلول‌های زایای بدوی، Activin A، کوچک مولکول IDE1.

۱- مقدمه

گونه‌های پرندگان به‌ویژه جوجه، نه تنها به‌عنوان یکی از مهم‌ترین حیوانات مزرعه منجر به تولید سالانه ۵۹ میلیارد عدد نتایج برای تامین پروتئین حیوانی می‌شود [1]، بلکه به‌عنوان مهم‌ترین مدل برای مطالعات زیست‌شناسی تکوینی، ایمونولوژی و علم فیزیولوژیکی نیز مورد توجه محققین قرار گرفته‌اند. بدین منظور در دهه اخیر، انواع مختلفی از سلول‌های بنیادی از جمله سلول‌های بنیادی جنینی^۳، سلول‌های زایای بدوی^۴ و سلول‌های

¹ Inducer Of Definitive Endoderm 1 (IDE1)

² quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR)

³ Embryonic stem cells (ESCs)

⁴ Primordial Germ Cells (PGCs)

بنیادی پرتوان القایی^۱ از مراحل مختلف تکوینی جوجه تولید شده است. در میان سلول‌های بنیادی جوجه، سلول‌های PGC خصوصیات منحصر به فردی از جمله انتقال اطلاعات ژنتیکی به نسل بعد، قابلیت دست‌کاری ژنتیکی و تولید پرندگان تراریخته دارد که آن‌ها را از بقیه سلول‌های بنیادی جوجه متمایز کرده است [2]. با این حال، تعداد سلول‌های PGCs که از یک جنین در مرحله گردش خون (مرحله HH 14-15 معادل ۲/۵ روز بعد از انکوباسیون) و غدد جنسی در مرحله HH 28-30 (معادل ۵ روز تا ۶ روز بعد از انکوباسیون) به دست می‌آیند، محدود هستند [5]-[3]؛ بنابراین، برای استفاده موثر از تعداد کم PGCs، باید تعداد آن‌ها را با کشت در شرایط آزمایشگاهی افزایش داد. از ابتدا تاکنون، تلاش‌هایی برای توسعه سیستم‌های کشت PGCs با استفاده از محیط‌های کشت مختلف و وابسته یا مستقل به سلول‌های تغذیه‌کننده (Feeder cell) انجام شده است. اگرچه کشت آزمایشگاهی PGCs منجر به تکثیر موفقیت‌آمیز در کوتاه‌مدت شده است، اما عدم تکثیر طولانی‌مدت و حفظ خود نوزایی در سیستم‌های کشت آزمایشگاهی یکی از چالش‌های اصلی این سلول‌ها است [6]. به گونه‌ای که حفظ خود نوزایی PGCs حتی در محیط کشت غنی شده حاوی فاکتورهای رشد مختلف، مانند فاکتور مهارکننده لوسمی^۲ [7]، فاکتور رشد فیبروبلاست پایه^۳، فاکتور سلول‌های بنیادی^۴ یا فاکتور رشد مشابه انسولین^۵ و پروتئین مورفوژنیک استخوان نوع ۴^۶ دشوار است [10]-[8]. مطالعات اخیر نشان داده است که مسیرهای سیگنالینگ شامل Wnt/Gsk3/β-catenin، BMP4/Smad1/5/8 و TGF-β/Activin/Smad2/3 نقش مهمی در خود نوزایی و کشت طولانی‌مدت PGCs جوجه دارند [1]، [11]-[13]. به گونه‌ای که وایت و همکاران [1] نشان دادند که فاکتورهای رشد BMP4 و Activin A منجر به فعال‌سازی مسیر پیام‌رسانی BMP/Smad1/5/8 و TGF-β/Smad2/3 و به نوبه خود فسفریلاسیون Smad2/3 و Smad1/5/8 می‌شوند که در نهایت با انتقال به هسته منجر به بیان ژن‌های موثر در خود نوزایی این سلول‌ها می‌شوند؛ بنابراین، این مطالعات نشان می‌دهند که انتقال سیگنال از طریق TGF-β/Activin/SMAD2/3 برای تکثیر و خود نوزایی PGCs جوجه ضروری است [1]، [13].

علاوه بر این، اخیراً محیط‌های کشت برای سلول‌های PGC با استفاده از کوچک مولکول‌های مهارکننده مسیرهای تمایزی، مانند IDE1 و SB43 معرفی شده‌اند که می‌توانند جایگزین مناسبی برای فاکتورهای رشد لازم در کشت و تکثیر سلول‌های PGC باشند [13]. کوچک مولکول‌ها به مولکول‌های آلی با وزن مولکولی کم گفته می‌شود که قادر به ایجاد اثرات مختلف زیستی روی سلول باشند. همچنین از این مولکول‌ها در کشت سلول‌های بنیادی پرتوان پستانداران بدون نیاز به فاکتورهای رشد، به منظور حفظ و تقویت پرتوانی و تمایزهای خاص دودمانی استفاده شده است [14]، [15]. علاوه بر این، کوچک مولکول IDE1 نقش مهمی در خود نوزایی و کشت طولانی‌مدت PGCs جوجه از طریق فعال‌سازی مسیر سیگنالینگ TGF-β دارد [13].

تأثیر انواع کوچک مولکول‌ها و فاکتورهای رشد با خواص خود نوزایی و یا تمایز می‌تواند در شرایط مختلف فیزیولوژیکی و یا بسته به نوع گونه (موشی، جوجه و انسانی) متفاوت باشد. نظر به وجود گزارش‌های محدود در مورد نقش کوچک مولکول‌ها و فاکتورهای رشد و استفاده از آن‌ها در فرایند خود نوزایی و تولید رده سلولی تکثیر پذیر PGC جوجه و عطف به تناقض گزارشات موجود، در تحقیق حاضر تلاش نموده‌ایم تا تأثیر فاکتور رشد و کوچک مولکول‌ها در تکثیر و خود نوزایی PGCs جوجه در شرایط کشت آزمایشگاهی را بررسی و راندمان آن‌ها را ارزیابی نماییم تا روشی موثر برای افزایش تکثیر PGCs جوجه مشتق شده از غدد جنسی معرفی کنیم.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- تخم نطفه‌دار جوجه و مراقبت‌های حیوانی

از مرغ مادر تخم‌گذار سویه لگهورن به تعداد ۳۲۰۰ عدد تخم نطفه‌دار از مزرعه مرغ مادر شرکت طیور برکت در استان قزوین تهیه گردید. در کل مراحل آزمایش، شرایط و امکانات برای نگهداری پرندوها، مطابق با کمیته مراقبت از حیوانات بخش سلول‌های بنیادی پژوهشگاه رویان^۷ فراهم گردید و دارای کد اخلاق IR.ACECR.ROYAN.REC.1397.283 می‌باشد.

¹ Induced Pluripotent Stem Cells (IPSCs)

² Leukemia Inhibitory Factor (LIF)

³ Fibroblast Growth Factor (bFGF)

⁴ Stem Cell Factor (SCF)

⁵ Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1)

⁶ Bone Morphogenetic Protein 4 (BMP4)

⁷ Animal Care Committee of Royan Institute for Stem Cell Biology & Technology (ACECR)

۲-۲- آماده سازی سلول های تغذیه کننده

در مطالعه حاضر از چهار لایه تغذیه کننده سلولی از بانک سلول پژوهشگاه رویان برای کشت PGCs جوجه استفاده شد: ۱- فیبروبلاست جنینی جوجه^۱، ۲- فیبروبلاست جنینی موش^۲، ۳- سلول های STO^۳ و ۴- BRL^۴. برای تهیه لایه تغذیه کننده MEF، اجسام جنینی جنین های موش در مرحله تکوینی dpc 12.5 جدا شده و با نمک بافر فسفات Dulbecco بدون Ca^{2+} و Mg^{2+} (DPBS⁻ Gibco™, 14190144) شستشو داده شد و با استفاده از روش آنزیمی، سوسپانسیون سلولی تهیه گردید. بدین صورت که اجسام جنینی جنین های موش در Trep/ EDTA (۵۳٪/۰/۰/۰/۰/۰ میلی مولار، Invitrogen، 25300-054) در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه گرماگذاری شدند. سپس به منظور غیر فعال سازی تریپسین، DMEM حاوی ۱۰٪ FBS به نمونه ها اضافه گردید و به آرامی پیتاز شدند و در نهایت نمونه ها با سرعت $400 \times g$ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس سلول های سوسپانسیون در فلاسک های کشت سلولی حاوی DMEM (Gibco™، 11960044) که با سرم جنین گاوی (FBS) ۱۰٪ (SH30071، Hyclone) غنی شده بودند، کشت داده شدند.

برای تهیه لایه تغذیه کننده CEF^۵، تخم نطفه دار مرغ در دمای ۳۷/۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ روز تا ۶ روز انکوباسیون شدند. جنین ها پس از رسیدن به مراحل ۳۰-۲۸ HH از زرده جدا شدند و با DPBS⁻ شستشو داده شدند و پس از حذف سر و قلب، از دیگر بافت های جنینی باقی مانده با استفاده از روش آنزیمی، سوسپانسیون سلولی تهیه گردید و در نهایت در فلاسک های T25 حاوی محیط کشت DMEM و ۱۰٪ FBS کشت داده شدند. در مرحله ای که تعداد سلول ها به راندمان ۱۰۰٪ در سطح فلاسک رسیدند، نصف محیط رویی دور ریخته شد و به ازای هر ۲/۵ ml محیط، ۲۵ میکرولیتر میتومایسین C (Sigma-Aldrich، 50077)، به آن افزوده و به مدت سه ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷C قرار داده شدند. سپس سلول ها پاساژ داده شدند و با استفاده از لام هموسایتومتر، سلول ها شمارش شدند. در نهایت سلول های فیبروبلاست جنینی موش و جوجه به عنوان لایه تغذیه کننده روی یک پلیت ۴۸ چاهک پوشش داده شده با ژلاتین ۰/۱٪ با تراکم ۳۰۰۰۰ سلول به ازای هر چاهک کشت و آماده شدند.

سلول های تغذیه کننده STO و BRL از بانک سلول پژوهشگاه رویان ثبتی با شماره سریال STO RSCB0009 و BRL 3a RSCB0572 تهیه شدند و به عنوان لایه تغذیه کننده سلول های PGC جوجه مشابه با سلول های فیبروبلاست جنینی موش و جوجه مورد استفاده قرار گرفتند.

۲-۲- جداسازی و کشت PGCs

جداسازی سلول های PGC جوجه مطابق با روش های قبلی منتشر شده انجام گردید [16]. برای جداسازی PGCs از غدد جنسی در مرحله HH28-30 تخم نطفه دار جوجه به مدت ۵-۶ روز انکوباسیون شدند. از هر جنین یک جفت غدد جنسی جدا شد و در Trep/ EDTA (۵۳٪/۰/۰/۰/۰/۰ میلی مولار، Invitrogen، 25300-054) در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه گرماگذاری شدند. برای غیر فعال سازی تریپسین، DMEM حاوی ۱۰٪ FBS به نمونه ها اضافه گردید و به آرامی پیتاز شدند و در نهایت نمونه ها با سرعت $400 \times g$ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند.

محیط کشت PGC شامل KO-DMEM (10829، Invitrogen)، ۷٪ FBS، ۲ میلی مولار گلوتامکس (35050، Invitrogen)، ۱× نوکلئوزید (Millipore، GSS-1016-C)، ۱× اسیدهای آمینه غیر ضروری (Invitrogen، 11140-050)، ۰/۱ میلی مولار β -مرکاپتوانول (Invitrogen، 21985)، ۱٪ Pen-Strep (Invitrogen، 15140-122)، ۲٪ سرم جوجه (Sigma، C5405) ۶ نانوگرم در میلی لیتر rmSCF (PeproTech، 250-03) و ۴ نانوگرم در میلی لیتر rhFGF (PeproTech، 100-18B) است. سلول ها در ۵۰۰ میکرولیتر از محیط کشت PGC شناور شدند و برای جداسازی سلول های PGC از سلول های سوماتیک به روش چسبندگی افتراقی در پلیت ۲۴ چاهکی قرار گرفتند. پس از ۴۸ ساعت سلول های شناور که PGC می باشند به پلیت های ۲۴ چاهکی جدید حاوی لایه های تغذیه کننده غیر فعال شده با میتومایسین یا پوشش داده شده با ماتریس های خارج سلولی^۶ منتقل شده و پاساژ سلول های PGC هر ۲ الی ۳ روز انجام شد. همه سلول ها در شرایط دمایی ۳۷ درجه سانتی گراد، ۵٪ CO₂ و رطوبت ۹۵٪ رشد کردند.

^۱ Chicken Embryonic Fibroblast (CEF)^۲ Mouse Embryonic Fibroblast (MEF)^۳ Sandos inbred mice 6-Thioguanine-resistant, Ouabain-resistant (STO)^۴ Buffalo Rat Liver-3A (BRL 3A) cell line^۵ Chicken Embryonic Fibroblast (CEF)^۶ Extracellular Matrices (ECM)

۳-۲- گروه‌های آزمایشی

سلول‌های PGC غدد جنسی جوجه با غلظت ۵۰۰۰۰ سلول به ازای هر خانه در پلیت ۲۴ چاهکی پوشش داده شده با ماتریژل (Matrigel) در چهار گروه و سه تکرار برای هر گروه آماده شدند. گروه‌های آزمایشی شامل گروه کنترل (محیط پایه برای کشت PGCs)، تیمار با کوچک مولکول IDE1 (100 nM; Stemgent, USA, 04-0026)، تیمار با فاکتور رشد Activin A (25 ng/ml; R&D Systems, 338-AC) و تیمار با SB431542 (10 μM; Cayman Chemical, 13031) بودند. شمارش سلول‌های PGC با هموسایتومتر در ۷، ۱۴ و ۲۱ روز پس از تیمار انجام شد.

۴-۲- ارزیابی فعال‌سازی مسیر سیگنالینگ TGF/β با qRT-PCR

برای ارزیابی فعال‌سازی مسیر سیگنالینگ TGF/β، ژن‌های SMAD2، SMAD3 و LFTTY1 با روش qRT-PCR کمی مورد بررسی قرار گرفتند و ژن GAPDH به عنوان ژن مرجع استفاده شد. بدین ترتیب ابتدا کل RNA سلولی از هر گروه آزمایشی به وسیله کیت TRIZol (Sigma-Aldrich)، به صورت جداگانه استخراج گردید و به مدت ۱۵ دقیقه با DNase I (Takara, 2270A) برای حذف DNA ژنومی تیمار شدند. سپس cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA Fermentas (K1632) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده سنتز شد و در مرحله بعد cDNA حاصله برای آنالیز qRT-PCR مبتنی بر SYBR Green Master Mix (Takara Bio, Inc., RR081Q) با سیستم Real-time PCR (Corbett Life Science; Rotor-Gene 6000) مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج توسط نرم‌افزار تحلیل Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Science; version 1.7) آنالیز شد. آنالیز داده‌های خام برای همه ژن‌های Smad2، Smad3، Lefty1 و GAPDH با استفاده از روش فافل و همکاران [17] انجام شد. تغییر بیان ژن‌ها در تیمارها با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ سنجیده شد. توالی‌های پرایمر ژن‌های مورد مطالعه در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱- توالی پرایمر ژن‌های پایین دست مسیر سیگنالینگ TGF/β.

Table 1- Primers sequences of genes downstream from TGF-β signaling.

Annealing Temperature (°C)	Amplicon Size (bp)	Sequences (5' to 3')	Genes
60	191	F: GCAATTACATACCAGAAACACCAC R: TATAGAACACCAGAATGCGGG	SMAD2
60	206	F: TACATCCCAGAGACACCTCC R: CGCTGGTTGAGTTCATAGTAGG	SMAD3
60	109	F: TCGTACTCTGGTTACTCGGG R: GCACCTTGTGGATGTTCTG	LEFTY1
60	150	F: AGTCCAAGTGGTTGCTATCA R: AAGATAGTGATGGCGTTCCC	GAPDH
60	229	F: TCAAGACTTACGACGACAAC R: ATTCCCCGTACCACACCAG	OCT4
60	180	F: TCGCTTCCTATTACCACTGTC R: CTCAGCCAATGTCCTGTAGAG	NANOG
60	160	F: CGAACAACCAGAAGAACAGC R: TCGGACAGCAGCTTCCACTC	SOX2
60	238	F: TTCTCCAACAGACCAACCAG R: AATCTCTGCTTCCAAAACCTC	CVH

GAPDH: Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase, OCT4: Octamer-binding Transcription factor 4,
SOX2: Sex determining region Y-box 2, CVH: Chicken Vasa Homolog

۵-۲- رنگ‌آمیزی پریودیک اسید شیف^۱

برای تأیید هویت PGCs جوجه، گرانول‌های گلیکوژن موجود در سیتوپلاسم با روش PAS رنگ‌آمیزی شدند. سلول‌ها در پارافورمالدئید ۴٪ تثبیت و با آب مقطر شسته شدند. سپس در اسید پریودیک ۰/۵٪ به مدت ۵ دقیقه اکسید و مجدداً شستشو داده شدند. در انتها تمامی سلول‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق با معرف اسید شیف ۰/۳٪ تحت تیمار قرار گرفتند و بعد از سه بار شستشو، زیر میکروسکوپ نوری مورد ارزیابی و سنجش قرار گرفتند.

^۱ Periodic Acid-Schiff (PAS)

۲-۶- رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی

پس از تثبیت سلول‌های کشت داده شده در پارافرمالدئید ۴٪ جرمی/حجمی در دمای اتاق، تمامی سلول‌ها تحت تیمار با Triton X-100 با غلظت ۰/۲٪ به مدت ۱۰ دقیقه نفوذپذیر شدند. سلول‌های آماده‌شده به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با آنتی‌بادی اولیه DAZL-1 تیمار و گرماگذاری شدند. پس از سه بار شستشو، سلول‌ها به مدت ۱ ساعت در دمای ۴ درجه در تاریکی با آنتی‌بادی ثانویه Anti-rabbit IgG-Alexa Fluor 488 رقیق‌شده گرماگذاری شدند. رنگ‌آمیزی سلول‌ها با DAPI (Sigma-Aldrich, D8417) به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انجام شد و سنجش و ثبت تصاویر با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت معکوس (Olympus IX-71) صورت گرفت. خصوصیات و جزئیات آنتی‌بادی‌های اولیه و ثانویه مورد استفاده برای رنگ‌آمیزی ایمنی در جدول ۲ فهرست شده‌اند.

جدول ۲- فهرست آنتی‌بادی بادی اولیه و ثانویه برای رنگ‌آمیزی هسته سلول‌های PGC جوجه.
Table 2- Lists the primary and secondary antibodies used for immunostaining nucleus chicken PGC.

Antibody	Cat. No.	Host	Dilution Ratio	Company
Primary antibody				
DAZL-1	Clone 7F.1	Rabbit IgG	1:100	Millipore
Secondary Antibody				
IgG-Alexa Fluor 488 Anti-rabbit	A-21206	Donkey IgG	1:500	Invitrogen

DAZL: Deleted in Azoospermia-Like

۲-۷- تحلیل آماری

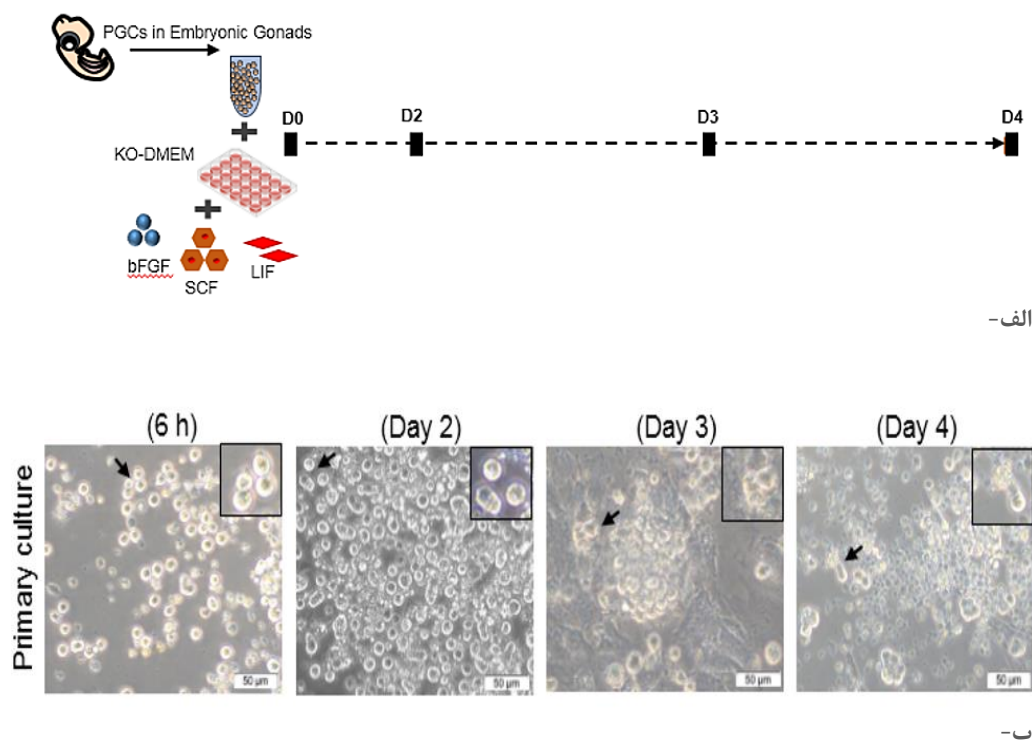
تجزیه و تحلیل آماری با نرم‌افزار GraphPad Prism 5.02 (GraphPad Software, Inc) انجام و به منظور مقایسه بین گروه‌های آزمایشی از آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و پس از آن از Tukey post-hoc استفاده شد. آزمون t مستقل برای تفاوت بین دو مشاهدات انجام شد. داده‌ها به صورت میانگین خطای استاندارد $\pm$ SEM برای mean برای حداقل سه نمونه آماری مستقل در هر گراف مشخص شدند و سطح معنی‌داری به صورت $P < 0.01$, **: در نظر گرفته شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- تولید سلول‌های PGC تحت شرایط کشت متعارف از مرحله HH28

نتایج جداسازی و تکثیر سلول‌های PGC از بافت غدد جنسی جنین ۵ روزه جوجه در شکل ۱ نشان داده شده است. غنی‌سازی و تکثیر سلول‌های PGCs در سیستم کشت چسبنده افتراقی (شکل ۱-الف) بر اساس روش وان‌دلایور و همکاران [18] با دقت و حساسیت بالایی انجام پذیرفت. نتایج نشان داد که پس از انکوباسیون سلول‌های PGCs همراه با سلول‌های استرومای گنادی به صورت هم‌کشتی به مدت ۶ ساعت، سلول‌های استرومای گناد به کف ظرف کشت متصل شدند (شکل ۱-ب) و سلول‌های منفرد PGC روی بستری از سلول‌های استرومایی به صورت سوسپانسیون با اندازه بزرگ (۲۰-۱۵ میکرومتر)، هسته کروی بزرگ خارج از مرکز و ذرات لیپیدی سیتوپلاسمی قابل تشخیص بودند (شکل ۱-ب). این سلول‌ها در حضور سلول‌های استرومایی گناد به مدت ۴۸ ساعت در یک کشت اولیه تکثیر شدند و قابلیت تکثیرپذیری بالای آن‌ها منجر به افزایش تعداد سلول‌ها گردید (شکل ۱). در غلظت‌های بالای تکثیر سلولی، احتمالاً سلول‌های PGCs، مولکول‌های شیمیایی ترشح می‌کنند که سبب جذب آن‌ها به یکدیگر شده و این فرایند منجر به تشکیل توده یا کلامپ سلولی در ۷۲ ساعت پس از کشت اولیه شد. علاوه بر این، در ۷۲ ساعت پس از کشت اولیه، سلول‌های PGCs تماس‌های محکمی با سلول‌های استرومای گناد برقرار کردند که منجر به احاطه آن‌ها توسط سلول‌های استرومای گناد گردید (شکل ۱-ب). هم‌چنین نتایج این پژوهش اثبات نمود که پس از ۷۲ ساعت از کشت اولیه، سلول‌های PGC جوجه در شرایط کشت متعارف شروع به آپوئوز نمودند و ۹۶ ساعت پس از شروع کشت، سلول‌های PGCs از بین رفتند (شکل ۱-ب).

این نتایج با یافته‌های مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۷ مطابقت دارد که گزارش کردند که سلول‌های PGCs، مولکول‌های شیمیایی (گلیکوپروتئین‌ها، پروتئین‌های سطح سلول) ترشح می‌کنند که PGC را به سمت یکدیگر جذب می‌کنند و در نتیجه کلامپ سلولی یا توده در ۷۲ ساعت پس از جداسازی و کشت سلول‌های PGC مشاهده می‌شود. تشکیل کلامپ‌ها در نهایت سمیت سلولی را در محیط کشت سلولی افزایش می‌دهد و در نتیجه منجر به کاهش نرخ تکثیر می‌شود [19]. از این رو، نتایج این مطالعه نشان داد که سلول‌های استرومای گنادی قادر به حمایت از تکثیر سلول‌های PGC نیستند؛ بنابراین، در تطابق با یافته‌های مطالعات پیشین به منظور غلبه بر این چالش از لایه‌های سلولی تغذیه‌کننده به عنوان بستر سلولی استفاده گردید [16]، [20]، [21].



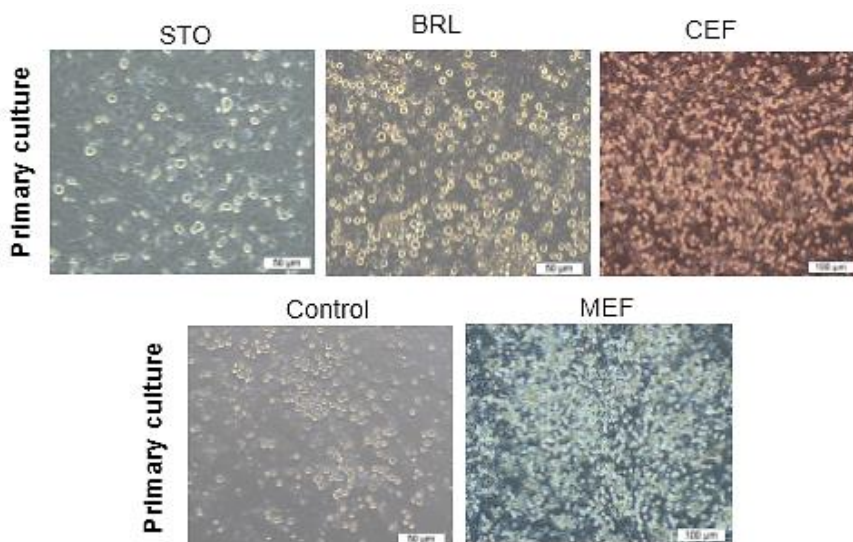
شکل ۱- تولید سلول‌های PGC جوجه تحت شرایط کشت متعارف؛ الف- خط زمانی جداسازی و کشت سلول‌های PGC جوجه در مرحله HH ۲۸-۲۹ در محیط کشت KO-DMEM حاوی سرم^۱ FBS، سرم جوجه و فاکتورهای رشد LIF، SCF و bFGF بر روی سلول‌های فیبربلاست گنادی جوجه، ب- تکثیر سلول‌های PGC در سیستم کشت افتراقی در روز ۰، ۲، ۳ و ۴ پس از کشت.

Figure 1- Derivation of chicken PGCs in conventional culture conditions: A. schematic and timeline for the isolation and culture of chicken PGCs at stages 28-29 HH in KO-DMEM medium supplemented with FBS, chicken serum, FGF2, SCF, and LIF in chicken gonadal fibroblast culture; B. enrichment of the isolated PGCs cultured on differential adherent culture systems at days 0, 2, 3, and 4. Scale bar: 50 μ m.

¹ Fetal Bovine Serum (FBS)

۲-۳- نتایج حاصل از جداسازی و کشت سلول‌های gPGC در حضور بسترهای سلولی

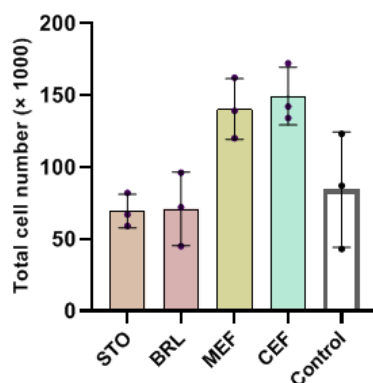
نتایج کشت سلول‌های PGC روی لایه‌های سلولی تغذیه‌کننده STO، MEF، CEF و BRL-3A در شرایط کشت متعارف در شکل ۲ ارائه شده است. بدین منظور، سلول‌های PGC پس از ۴۸ ساعت کشت روی سلول‌های استرومای گنادی، جمع‌آوری شدند و روی لایه‌های سلولی تغذیه‌کننده STO، MEF، BRL، CEF و CEF که از نظر میتوزی با میتومایسین-C غیرفعال شده بودند، کشت داده شدند. سپس به منظور بررسی نرخ تکثیر، بعد از ۷ روز از هم‌کشتی با لایه‌های سلولی تغذیه‌کننده، سلول‌های PGC با هموسایتومتر شمارش شدند و نتایج نشان داد که کشت سلول‌های PGC روی لایه‌های سلولی STO، BRL، MEF و CEF منجر به افزایش تعداد سلول‌ها به میزان ۸۲۰۰۰، ۹۶۰۰۰، ۶۲۰۰۰ و ۱۷۲۰۰۰ به ترتیب شدند (شکل ۲).



شکل ۲- تولید سلول‌های PGC جوجه تحت شرایط کشت متعارف روی بسترهای سلولی STO، CEF، BRL، فیبربلاست جنینی موش MEF.

Figure 2- Derivation of chicken PGCs in conventional culture conditions on STO, BRL, MEF, and CEF feeder cell layers. Scale bar: 50 and 100 μm.

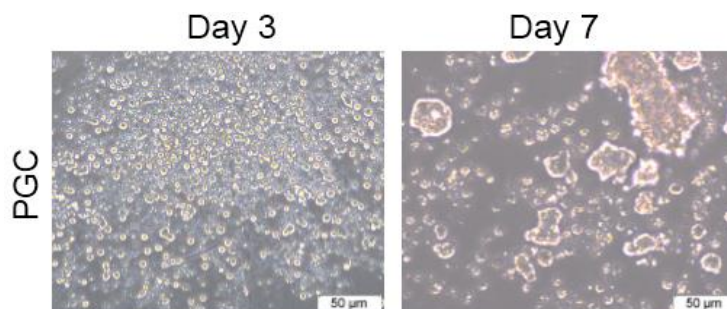
بررسی راندمان تکثیر و نرخ رشد سلول‌های PGC در حضور انواعی از بسترهای سلولی در شکل ۳ نشان می‌دهد که راندمان تکثیر و نرخ رشد در حضور بسترهای سلولی STO و BRL پایین است و در مقایسه با گروه کنترل منجر به تفاوت آماری قابل توجهی نشد. بااین حال، راندمان تکثیر و نرخ رشد در حضور بسترهای سلولی MEF ($P < 0.05$) و CEF ($P < 0.01$) افزایش قابل توجهی نشان داد و به عنوان مناسب‌ترین بسترهای سلولی برای کشت PGCs در مقایسه با دیگر گروه‌های تیماری شناسایی گردید (شکل ۳).



شکل ۳- راندمان تکثیر سلول‌های PGC جوجه در حضور بسترهای سلولی STO، BRL، CEF و فیبربلاست جنینی موش MEF.

Figure 3- Proliferation efficiency of chicken PGCs on STO, BRL, MEF and CEF feeder cell layers.

بررسی کشت طولانی مدت نشان داد که برقراری ارتباطات سلولی بین سلول‌های PGCs با سلول‌های MEF و CEF منجر به تشکیل کلاسترهای کروی می‌شود (شکل ۴) که کاهش نرخ تکثیر سلولی و پیشروی سلول‌های به سمت آپوپتوز را منجر شد. از آنجایی که کلاسترهای کروی منجر به عدم امکان تبادل هم‌زمان مواد مغذی و مواد شیمیایی مورد نیاز سلول‌های PGC می‌شوند، از رشد و تکثیر طولانی مدت سلول‌های PGCs روی بسترهای سلولی جلوگیری می‌کنند.



شکل ۴- کشت طولانی مدت سلول‌های PGC در حضور بسترهای سلولی CEF و فیبربلاست جنینی موش MEF در روز ۳ و ۷ پس از کشت اولیه.

Figure 3- Long-term culture of chicken PGCs on MEF and CEF feeder cell layers at days 3 and 7 after the primary culture. Scale bar: 50 μm.

جدول ۳- نرخ زنده‌مانی و کشت طولانی مدت سلول‌های PGC جوجه در حضور بسترهای سلولی STO، CEF، BRL، فیبربلاست جنینی موش MEF و گروه کنترل بدون لایه تغذیه‌کننده.

Table 3- Survival rate and long-term culture of chicken PGCs on STO, BRL, MEF, and CEF feeder cell layers and control group without feeder cell layer.

Types of Cell Substrates	Number of Eggs	Number of Cell Passages	Days of Cell Culture
STO	200	2	7
BRL	200	2	7
MEF	200	2	7
CEF	200	2	7
Control	200	2	7

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که سلول‌های STO طی پاساژهای سلولی مختلف از کف ظرف کشت‌کننده می‌شوند و به صورت سوسپانسیون مشابه با سلول‌های PGC بر روی بستر سلولی رشد می‌نمایند که به دلایل مورفولوژی مشابه با سلول‌های PGC، از همدیگر قابل تشخیص نیستند و از سوی دیگر مانع از رشد و تکثیر سلول‌های PGC نیز می‌شوند. محققان غلظت بالایی سلول‌های STO در پلیت‌های کشت حاوی PGC را از دلایل این امر ذکر کرده‌اند و غلظت پایین سلول‌های تغذیه‌کننده در زمان هم‌کشتی با دیگر سلول‌ها را ضروری شمرده‌اند [18]. با این حال، برخی مطالعات پایداری PGC با استفاده از لایه سلول‌های تغذیه‌کننده STO حاوی FBS در محیط کشت را نیز توصیف کردند [22]. هم‌چنین نتایج این مطالعه نشان داد که کشت سلول‌های PGC روی بستر سلولی BRL نرخ تکثیر مشابهی در مقایسه با STO حاصل می‌کند، اما با این حال، منجر به کشت طولانی مدت نگردید. مطالعه اتچز و همکاران [23] نشان داد که PGCs جدا شده از جریان خون بر روی سلول‌های تغذیه‌کننده STO و BRL قابلیت کشت و تکثیر را دارند.

بستر سلولی MEF از خاصیت خود نوزایی سلول‌های بنیادی موش حمایت می‌کند [24]. نتایج این مطالعه نشان داد که محققان بیان داشته‌اند که سلول‌های PGC کشت شده روی بستر سلولی MEF منجر به افزایش تکثیر سلول‌های PGC می‌شود، ولی قادر به تشکیل کلنی نیست که تاییدی بر نتایج پارک و هان [25] می‌باشد. در مقابل، خی و همکاران [26] گزارش کردند که هم‌کشتی PGC روی بستر سلولی MEF زمانی منجر به بالاترین تکثیر سلولی می‌شود که از پلیت‌های پوشش داده شده با غشای PET به عنوان مسدود کننده ارتباطات سلول PGC با سلول‌های MEF استفاده شود تا سلول‌های PGC تنها از ترشحات سلول‌های MEF برای خودنوزایی استفاده کنند. به طور کلی، نتایج این پژوهش اثبات نمود که سلول‌های PGC کشت شده روی بستر سلولی CEF توانایی تشکیل کلنی و تکثیر را دارند و می‌توانند به عنوان بهترین بستر برای تکثیر PGC انتخاب شوند. محققان نیز در سال ۲۰۰۷ بستر CEF را نیز به عنوان بستری مناسب و مطلوب برای کشت سلول‌های PGC پیشنهاد نموده‌اند [10].

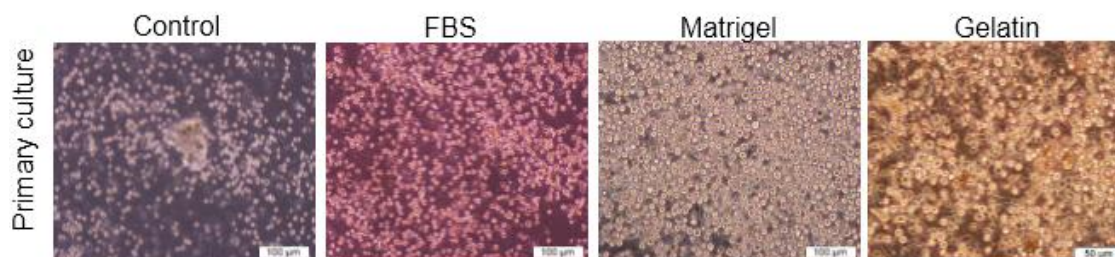
از آنجایی که سیتوکین‌های ترشح شده از سلول‌های تغذیه‌کننده برای بقا و خودنوزایی سلول‌های PGC جوجه ضروری هستند و منجر به ترشح فاکتورهای رشد ضروری در محیط کشت می‌شوند که تمایز سلول‌های زایا را مهار می‌کنند و منجر به افزایش تکثیر سلول‌های PGC می‌شوند [18]،

[26]. با این وجود، برخی از عوامل آزاد شده دارای اثرات نامطلوب بر خودنوزایی سلول‌های بنیادی هستند [27]. علاوه بر این، جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی جوجه با حضور یک لایه تغذیه‌کننده منجر به تغییر در ترکیبات محیط کشت می‌شود که می‌تواند ویژگی‌های نهایی این سلول‌ها را تحت تأثیر قرار دهد [28]. به گونه‌ای که استفاده از بسترهای سلولی مشتق از سلول‌های حیوانی ناهمگن خطر انتقال پاتوژن‌هایی از حیوانات دیگر به سلول‌های PGC وجود دارد [29]؛ بنابراین به منظور حذف عوامل اشاره شده در مطالعه حاضر از بسترهای غیر سلولی به منظور کشت سلول‌های PGC استفاده شد.

۳-۳- نتایج حاصل از جداسازی و کشت سلول‌های PGC حضور بسترهای غیر سلولی

با توجه به این که در حضور بستر سلولی تحت شرایط کشت متعارف، سلول‌های PGC در روزهای نخستین کشت قابلیت تکثیرپذیری خود را از دست دادند؛ بنابراین در بخش بعدی، نقش FBS و بسترهای غیر سلولی ECM شامل ژلاتین و ماتریژل تحت شرایط کشت متعارف روی تکثیر و زنده‌مانی سلول‌های PGC جوجه مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۴). بدین منظور، سلول‌های PGC پس از ۴۸ ساعت کشت روی سلول‌های استرومای گنادی، جمع‌آوری شدند و بر روی صفحات پوشش داده شده با FBS، ژلاتین و ماتریژل کشت و در انکوباتور ۵% CO₂ در دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوباسیون شدند. هم‌چنین، به منظور استفاده از فاکتورهای ضروری مترشحه از سلول‌های تغذیه‌کننده از محیط KO-DMEM غنی شده با فیبریلاست جنین جوجه CEF استفاده شد که نه تنها امکان دسترسی مواد مغذی مترشحه از سلول‌های CEF برای سلول‌های PGC فراهم می‌شود، بلکه منجر به عدم ارتباطات سلول‌های PGC با سلول‌های CEF و ممانعت از تشکیل کلاسترهای کروی می‌شود [30]، [31].

نتایج نشان داد که PGCs کشت‌شده روی پلیت پوشش داده شده با ژلاتین دارای نرخ تکثیر آهسته و مدت زمان زنده‌مانی پایینی است و سلول‌های PGC شناور تمایل به تشکیل کلاسترهای کروی دارند (شکل ۵)، اما PGCs کشت‌شده در پلیت پوشش داده شده با ماتریژل و FBS در مقایسه با ژلاتین و گروه کنترل، نرخ تکثیر و مدت زمان زنده‌مانی بالاتری دارند (شکل ۵). علاوه بر این، بستر غیر سلولی ژلاتین در اولین پاساژ منجر به تکثیر زیادی از سلول‌ها گردید، اما تکثیر خود را در دومین پاساژ سلولی از دست داد و اغلب سلول‌ها به سمت تمایز پیش رفتند. در مقابل بستر غیر سلولی ماتریژل، منجر به افزایش راندمان تکثیر سلول‌های PGC در طی پاساژهای مختلف در مقایسه با گروه کنترل و دیگر گروه‌های تیماری گردید.

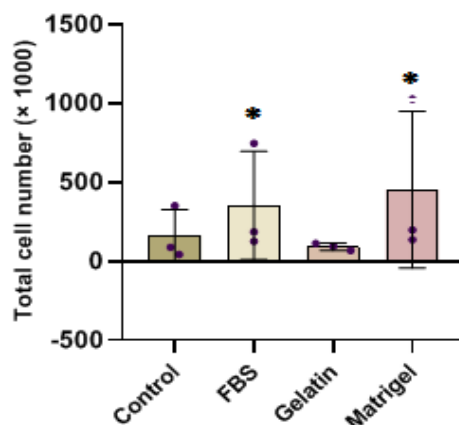


شکل ۵- تکثیر سلول‌های PGC جوجه تحت شرایط کشت متعارف روی FBS و بسترهای غیر سلولی ECM شامل ژلاتین و ماتریژل، FBS و ماتریس‌های خارج سلولی (تفاوت بین تصاویر در اثر تکنیک رنگ زمینه بودجود آمده است).

Figure 5- Proliferation of chicken PGCs in conventional culture conditions on FBS and various ECM (gelatin and Matrigel) feeder layer-free culture systems. Scale bar: 50 and 100 μ m.

نتایج مقایسه آماری نرخ تکثیر سلولی در گروه‌های مختلف بستر غیر سلولی در شکل ۶ نشان داد که سلول‌های PGC در حضور بسترهای غیر سلولی FBS و ماتریژل، در مقایسه با گروه کنترل (بدون بستر سلولی و یا فاکتور رشد) و گروه ژلاتین ($p < 0.05$) نرخ تکثیر و بالاترین تراکم سلولی را دارند (شکل ۶). به گونه‌ای که تعداد PGCs کشت‌شده در پلیت پوشش داده شده با بسترهای غیر سلولی FBS و ماتریژل در حدود دو هفته به نزدیک یک میلیون سلول تکثیر رسیدند (شکل ۶).

کشت طولانی مدت سلول‌های PGC در حضور بسترهای غیر سلولی در همه گروه‌های تیماری و در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ پس از کشت بررسی و شمارش شد. نتایج نشان داد که سلول‌های کشت شده روی پلیت پوشش داده شده با FBS پس از گذشت ۱۰ روز از کشت اولیه، به سمت آپوپتوز سلولی پیش رفتند و در نهایت از بین رفتند. در مقابل سلول‌های کشت شده روی پلیت پوشش داده شده با ماتریژل، بالاترین میزان زنده‌مانی را به مدت ۲۰ روز در مقایسه با دیگر بسترهای غیر سلولی نشان دادند (جدول ۴).



شکل ۶- راندمان تکثیر سلول‌های PGC جوجه در حضور بسترهای غیر سلولی FBS، ژلاتین و ماتریژل، (***) $p < 0.001$.

Figure 6- Proliferation efficiency of chicken PGCs on FBS and various ECM (gelatin, and Matrigel) feeder layer-free culture system.

جدول ۴ - نرخ زنده‌مانی و کشت طولانی‌مدت سلول‌های PGC جوجه در حضور بسترهای غیر سلولی FBS، ژلاتین و ماتریژل.

Table 4- Survival rate and long-term culture of chicken PGCs on FBS and various ECM (gelatin, and Matrigel) feeder layer-free culture system.

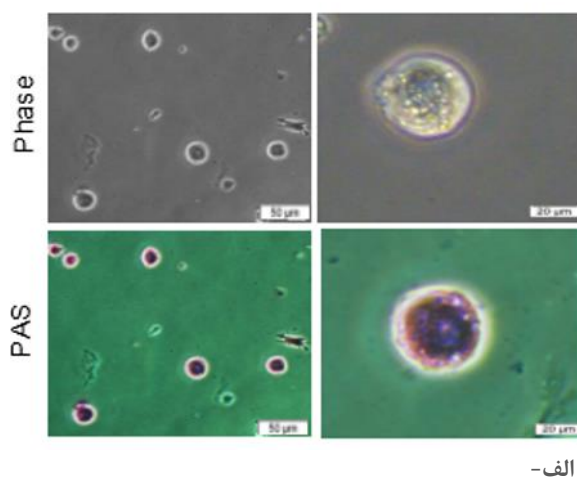
Number of Eggs	Number of Cell Passages	Days of Cell Culture	Types of Cell Substrates
250	5	20	Matrigel
250	3	10	FBS
250	2	7	Gelatin
250	2	7	Control

محققان افزایش زنده‌مانی در تیمار ماتریژل را با ترکیبات ماتریژل که حاوی لامینین، کلاژن نوع IV و بخشی از ماتریس خارج سلولی (لامینین مصنوعی یا فیبرونکتین) است مرتبط دانسته‌اند، بدین صورت که ماتریکس خارج سلولی از طریق گیرنده اینتگرین منجر به ارسال سیگنال‌های خارج سلولی درگیر در تکثیر، مهاجرت و تمایز سلول‌های بنیادی می‌شود. از سوی دیگر، تجزیه و تحلیل مورفولوژیکی PGCها نشان داده است که سلول‌های PGC دارای ظاهری کروی شکل با میکروویل‌های متعددی هستند [32] که هنگام کشت روی یک لایه کلاژن همانند ماتریژل، Pseudopodia کوچک به منظور اتصال بین به آن، تولید می‌کنند [8]، [33]. برقراری اتصال بین سلول‌های PGCs با ماتریژل منجر به کاهش اتصالات بین PGCs و ممانعت از تشکیل کلاسترهای کروی شکل می‌شود [1]، [8].

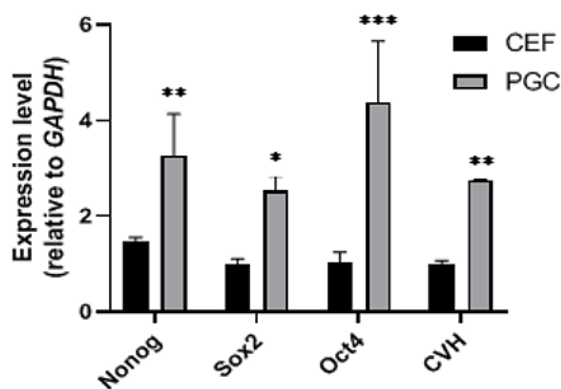
۳-۴- ارزیابی سلول‌های PGC کشت شده روی پلیت پوشش داده شده با ماتریژل

ارزیابی مورفولوژیکی سلول‌های PGC کشت شده روی ظروف پوشش داده شده با ماتریژل و محیط کشت KO-DMEM غنی شده با محیط CEF و فاکتورهای رشد (bFGF، LIF و SCF)، نشان داد که سلول‌های PGC پس از ۲۰ روز از کشت اولیه، دارای اشکال کروی (۱۵-۲۰ میکرومتر) با ظاهر دانه‌ای مسطح حاوی وزیکول‌های چربی هستند (شکل ۷-الف) و در رنگ‌آمیزی اختصاصی گلیکوژن (PAS) به صورت رنگ ارغوانی (حاصل از برهم‌کنش رنگ با گروه‌های کربوهیدراتی گلیکوژن موجود در سیتوپلاسم سلول‌های PGC) قابل مشاهده هستند (شکل ۷-ج). علاوه بر این، نتایج ارزیابی پرتوانی و اختصاصیت سلول‌های PGCs حاکی از افزایش بیان ژن‌های مرتبط با پرتوانی، از جمله Oct4، Nanog و Sox2 و ژن CVH به عنوان نشانگر اختصاصیت سلول‌های زایا، در مقایسه با گروه کنترل منفی (CEFs) بود (شکل ۷). بررسی ایمونوسیتوشیمی (ICH) نشان داد که نشانگر DAZL در هسته سلول‌های PGC بیان شده است (شکل ۷).

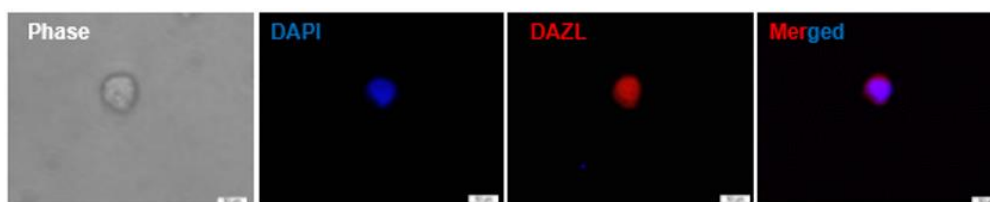
هان و پارک [34] بیان ژن‌های پرتوانی cOct4، cNanog، cKit، cENS-1، cMyc، cPrdm14 و cSall4 را در سلول‌های PGC جوجه را گزارش کردند. یخ‌کشی و همکاران [13] نشان دادند که بیان ژن‌های پرتوانی در سلول‌های PGC بلدرچین در مقایسه با گروه کنترل در روز ۳۵ از کشت اولیه افزایش قابل توجهی داشته است.



الف -



ب -



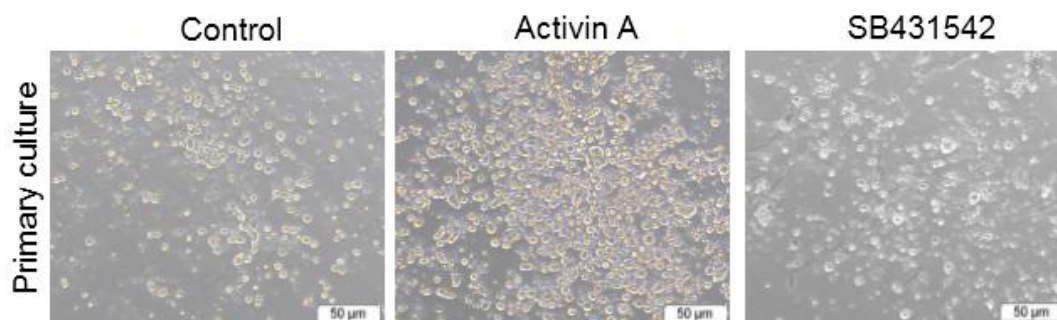
ج -

شکل ۷- ارزیابی سلول‌های PGC جوجه روی پلیت پوشش داده شده با ماتریژل؛ الف- رنگ‌آمیزی PAS، ب- RT-PCR برای ژن‌های مرتبط با پرتوانی (Oct4، Nanog و Sox2) و ژن CVH به‌عنوان نشانگر اختصاصیت سلول‌های زایا در سلول‌های PGC و گروه کنترل (CEFs)، ج- رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسنت برای نشانگر DAZL.

Figure 7- Characterization of chicken PGCs on Matrigel-coated plates; A. PAS staining, B. qRT-PCR for expressions of genes related to pluripotency OCT4, NANOG, and SOX2, and CVH gene as a specific germ cell lineage marker in chicken PGCs and control group (CEFs), C. immunofluorescence staining for markers DAZL. Scale bar: 50 μ m.

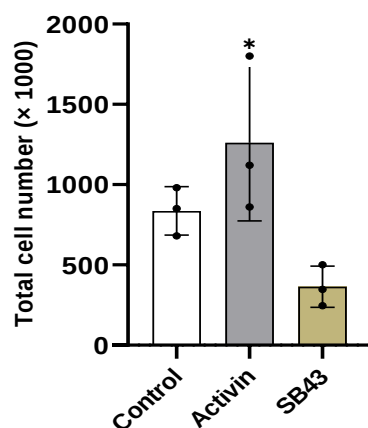
۳-۵- تاثیر فاکتور رشد Activin A در تکثیر و خودنوازی سلول‌های PGC جوجه

با توجه به اهمیت مسیر سیگنالینگ TGF- β /Activin/SMAD2/3 در خودنوازی سلول‌های بنیادی اپی‌بلاست پستانداران (epiSCs)، سلول‌های بنیادی جنینی انسان (hESCs) و iPSCs انسانی [35]، اخیراً نقش این مسیر در خودنوازی PGCs پرندگان نیز گزارش شده است [1]. نتایج مطالعه حاضر در خصوص فعال‌سازی مسیر سیگنالینگ TGF- β با استفاده از لیگاند Activin A و تاثیر آن در خودنوازی سلول‌های PGCs جوجه نشان داد که تیمار سلول‌های PGC با Activin A منجر به افزایش راندمان تکثیر سلولی به بیش از ۴ برابر در مقایسه با گروه کنترل منفی (بدون فاکتور رشد) و کنترل مثبت (دارای مهارکننده SB431542) گردیده است (شکل ۸ و شکل ۹). هم‌چنین شمارش سلول‌های PGC با هموسایتومتر پس از ۲۰ روز از تیمار به منظور بررسی کشت طولانی‌مدت و مدت‌زمان زنده‌مانی نشان داد که گروه Activin A منجر به افزایش مدت‌زمان زنده‌مانی سلول‌ها به مدت ۲۵ روز گردید، اما منجر به کشت طولانی‌مدت نشد (جدول ۵). در مقابل، گروه SB431542، منجر به تکثیر آهسته و کاهش نرخ زنده‌مانی در ۷ روز پس از تیمار شد و در روز ۱۰ پس از کشت اولیه، سلول‌ها شروع به انحطاط و مرگ سلولی کردند (جدول ۵).



شکل ۸- تاثیر فاکتورهای رشد Activin A و SB431542 روی تکثیر و خودنوازی سلول‌های PGC.

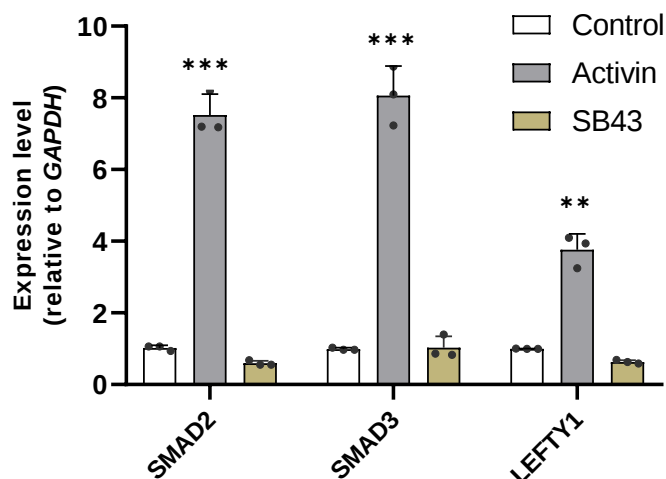
Figure 8- Effect of Activin A and SB431542 on proliferation and self-renewal of chicken PGCs.



شکل ۹- راندمان تکثیر سلول‌های PGC جوجه در حضور فاکتور رشد Activin A و کوچک مولکول SB0431542، (***: p < 0.001).

Figure 9- Proliferation efficiency of chicken PGCs on Activin A growth factors and Small molecule (SB431542).

بررسی بیان ژن‌های SMAD3، SMAD2 و LFTTY1 در گروه‌های آزمایشی Activin A، SB431542 و کنترل به منظور کاوش نقش مسیر سیگنالینگ TGF/ β نشان داد که تیمار با Activin A منجر به افزایش بیان ژن‌های Smad2، Smad3 و LFTTY1 به ترتیب به میزان ۷، ۸ و ۳ برابر در مقایسه با گروه کنترل منفی شد (شکل ۱۰). هم‌چنین گروه SB0431542 منجر به کاهش سطح بیان ژن‌های SMAD2، SMAD3 و LFTTY1 در مقایسه با گروه کنترل و Activin A شد. نتایج به‌دست‌آمده نقش مسیر سیگنالینگ TGF/ β در بیان ژن‌های پایین‌دست موثر در خودنوازی و تکثیر سلول‌های بنیادی را اثبات می‌نماید.



شکل ۱۰- ارزیابی بیان ژن‌های پایین دست مسیر سیگنالینگ TGF- β در سلول‌های

PGCs با استفاده از qRT-PCR (***: $p < 0.001$).

Figure 10- Characterization expansion of genes downstream from TGF- β signaling of PGCs by qRT-PCR.

نتایج نشان دادند که تیمار Activin A به عنوان لیگاند TGF- β منجر به بهبود بقا و تکثیر PGC جوجه گردید که با توجه به مقالات دیگر این عملکرد از طریق فعال‌سازی هتروداایمرهای TGF- β R و فسفریلاسیون SMAD2/3 انجام می‌شود و به نوبه خود منجر به افزایش یا کاهش صدها ژن در مدت زمان ۱ الی ۲ ساعت پس از تیمار می‌شود [36]–[38]. نتایج این تحقیق ضرورت توجه به مسیر پیام‌رسانی TGF β در تکثیر سلول‌های PGC جوجه در محیط کشت را آشکار می‌نماید و اثر مسیر پیام‌رسانی Smad2/3 به عنوان یک مسیر مهم در تکثیر سلول‌های PGC را پررنگ‌تر می‌نماید. به عبارتی دیگر، ابر خانواده TGF- β دارای لیگاندهای مختلفی از جمله Nodal، TGF- β ، BMP و Activin هستند که هرکدام آن‌ها نقش مهمی در خودنوزایی PGC جوجه ایفا می‌کنند [14]. این ابر خانواده با اتصال لیگاند Activin به گیرنده‌های سلولی منجر به فسفریلاسیون Smad 2/3 می‌شود که پروتئین‌های Smad 2/3 با Smad4 تشکیل کمپلکس می‌دهند و به هسته سلول منتقل می‌شوند و منجر به تغییراتی در تنظیم رونویسی در سطح DNA و تنظیم بیان ژن‌های لازم برای خودنوزایی می‌گردد [39].

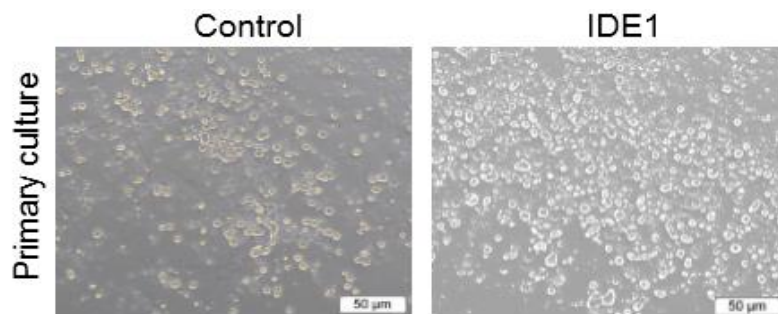
وایت و همکاران [1] گزارش نموده‌اند که مسیرهای پیام‌رسانی TGF- β /Activin/Nodal در سلول‌های PGC جوجه در شرایط *in vivo* و *in vitro* فعال است و منجر به خودنوزایی PGC در ترکیب با FGF2 و انسولین می‌شود. یخ کشی و همکاران [13] بیان داشته‌اند که فعال‌سازی مسیر پیام‌رسان TGF- β در سلول‌های PGC بلدرچین با استفاده از لیگاند Activin A منجر به فسفریلاسیون SMAD2/3 می‌شود که در نهایت تکثیر سلول‌های PGC مشتق از غدد جنسی بلدرچین را در پی خواهد داشت.

۳-۶- تولید سلول‌های PGC تحت شرایط کشت تعریف‌شده با استفاده از کوچک مولکول IDE1

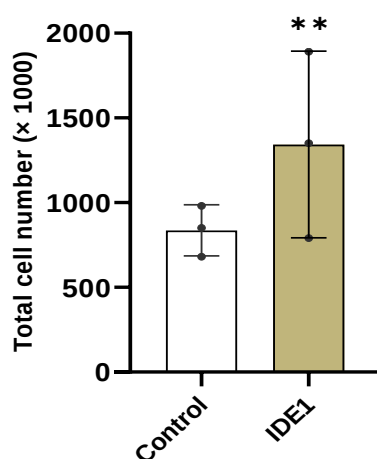
بررسی نقش IDE1 در نرخ تکثیر سلول‌های PGC جوجه نشان داد که تیمار سلول‌های PGC با کوچک مولکول IDE1 منجر به افزایش نرخ تکثیر به میزان ۶۴٪ و خودنوازی سلول‌های به مدت زمان ۲۵ روز پس از کشت اولیه در مقایسه با گروه کنترل گردید (شکل ۱۱ و شکل ۱۲)، اما منجر به کشت طولانی مدت در شرایط آزمایشگاهی نگردید (جدول ۵).

ارزیابی بیان ژن‌های SMAD2، SMAD3 و LEFTY1 در گروه‌های آزمایشی IDE1 و کنترل به منظور بررسی نقش مسیر سیگنالینگ TGF/ β نشان داد که تیمار با IDE1 منجر به افزایش بیان ژن‌های Smad2، Smad3 و LEFTY1 در مقایسه با گروه کنترل شد (شکل ۱۳). این نتایج نقش IDE1 در فعال‌سازی تکثیر PGCs جوجه با القای فسفریلاسیون SMAD2 و فعال‌سازی مسیر سیگنالینگ TGF/ β را تایید می‌کند ولی منجر به

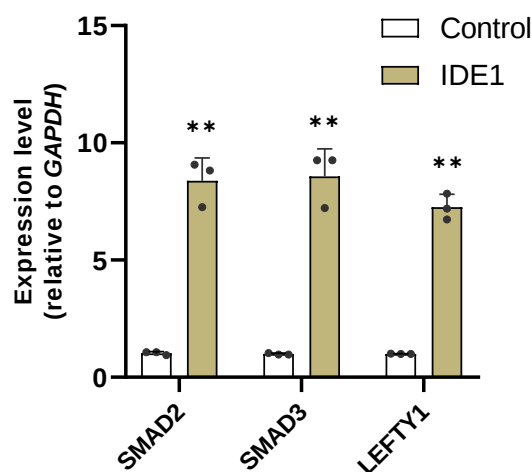
رفع چالش عدم توانایی کشت طولانی مدت سلول PGC نگردید. نتایج پژوهش بروویک و همکاران [40] نشان می‌دهد که کوچک مولکول IDE1 مشابه با اثرات Activin A منجر به القای فسفوریلاسیون SMAD2 پس از ۲۴ ساعت یا بیشتر می‌شود.



شکل ۱۱- تاثیر فاکتورهای رشد IDE1 روی تکثیر و خودنوزایی سلول‌های PGC.
Figure 11- Effect of IDE1 on proliferation and self-renewal of chicken PGCs.



شکل ۱۲- تاثیر کوچک مولکول‌های IDE1 روی تکثیر سلول‌های PGC.
Figure 12- Effect of IDE1 Small molecule on the expansion of chicken PGCs.



شکل ۱۳- ارزیابی بیان ژن‌های پایین دست مسیر سیگنالینگ TGF-β سلول‌های PGCs با استفاده از qRT-PCR (***: p < 0.001).

Figure 13- Characterization expansion of genes downstream from TGF-β signaling of PGCs by qRT-PCR.

جدول ۵- نرخ زنده‌مانی و کشت طولانی‌مدت سلول‌های PGC جوجه در حضور کوچک مولکول (IDE1 و SB431542) و فاکتور رشد Activin A.

Table 5- Survival rate and long-term culture of chicken PGCs on Small molecule (IDE1 and SB431542) and Activin A growth factors.

Treatments	Days of Cell Culture	Number of Cell Passages	Number of Eggs
Control	25	7	300
Activin A	25	8	300
IDE1	25	8	300
SB431542	7	2	300

کوچک مولکول IDE1 با فعال‌سازی SMAD2 در خودنوزایی سلول‌های PSC انسانی نقش دارد [40]. اخیراً از این کوچک مولکول‌ها در کشت سلول‌های بنیادی پرتوان پستانداران بدون نیاز به فاکتورهای رشد، به‌منظور حفظ و تقویت پرتوانی استفاده می‌شود [14]، [15]. نتایج این تحقیق بیان می‌دارد که احتمالاً فسفوریلاسیون SMAD2/3 توسط IDE1 ممکن است نقش کلیدی در حفظ بیان OCT4 و NANOG داشته باشد که برای شناسایی سلول‌های زایای و خودنوزایی آن‌ها ضروری است.

۴- نتیجه‌گیری

از آنجاکه، مسیر سیگنال دهی TGF- β /Activin/Nodal در PGC موشی منجر به مهار خودنوزایی می‌شود، به‌عنوان مهم‌ترین مسیر مرتبط با خودنوزایی و کشت طولانی‌مدت در سلول‌های PGC جوجه محسوب می‌شود. به‌گونه‌ای که در مطالعه حاضر، فعال‌سازی این مسیر با استفاده از فاکتور رشد Activin A و کوچک مولکول IDE1 منجر به حفظ پرتوانی PGCs به مدت ۲۵ روز از طریق افزایش بیان ژن‌های پایین دست مسیرهای سیگنالینگ SMAD2/3CA شد، اما این فعال‌سازی موفق به تولید لاین تکثیرپذیر PGC و کشت طولانی‌مدت آن نشد. این مطالعه نشان می‌دهد که SMAD2/3 کوفاکتورهای رایج و قدرتمندی هستند که باعث ایجاد پرتوانی و خودنوزایی در PGCs جوجه در کوتاه‌مدت می‌شوند. درمجموع، شواهد *in vitro* و *in vivo* نشان داد که PGC جوجه با توجه به تکوین منحصربه‌فرد آن از نظر رفتار عملکردی و ماشین‌های انتقال سیگنال با PGC پستانداران کاملاً متفاوت است و ارتباط همه مسیرهای سیگنالینگ با همدیگر منجر به تولید لاین سلولی می‌شود. اگرچه اخیراً مطالعات متعددی تولید سلول‌های PGC را نشان داده‌اند، اما بازنمایی همه ویژگی‌های پرتوانی در کشت طولانی‌مدت پایدار هنوز به دست نیامده است. با توجه به خصوصیات منحصربه‌فرد سلول‌های PGC جوجه، تولید لاین‌های PGC نیازمند تلاش‌های بیشتری برای شناسایی مکانیسم‌های مولکولی زیربنایی و گفتگوی متقابل بین مسیرهای سیگنالینگ مختلف است. دستیابی به سلول‌های تکثیرپذیر PGC جوجه در جهت تولید واکسن و آنتی‌بادی مونوکلونال یکی از موضوعات مورد توجه محققان در سراسر جهان است که ضرورت مطالعات زمینه‌ای و تثبیت پروتوکول‌های جداسازی و کشت این سلول‌های وجود دارد. عدم وجود گزارشی در این زمینه در ایران منجر گردید که مطالعه حاضر برنامه‌ریزی گردد.

سپاسگزاری

این مقاله از پایان‌نامه دوره دکتری رشته ژنتیک و اصلاح نژاد دام و طیور مصوب در دانشگاه گیلان و پژوهشگاه رویان استخراج شده است. نویسندگان بر خود لازم می‌دانند مراتب تشکر صمیمانه خود را از اعضای هیئت علمی پژوهشگاه سلول‌های بنیادی پژوهشگاه رویان (تهران، ایران) و دانشگاه گیلان (رشت، ایران) که ما را در انجام و ارتقای کیفی این تحقیق یاری دادند، اعلام کنند.

عدم تعارض منافع

نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافی ندارند.

منابع

- [1] Whyte, J., Glover, J. D., Woodcock, M., Brzezczynska, J., Taylor, L., Sherman, A., ... & McGrew, M. J. (2015). FGF, Insulin, and SMAD signaling cooperate for avian primordial germ cell self-renewal. *Stem cell reports*, 5(6), 1171–1182. DOI:10.1016/j.stemcr.2015.10.008
- [2] Nakamura, Y., Tasai, M., Takeda, K., Nirasawa, K., & Tagami, T. (2013). Production of functional gametes from cryopreserved primordial germ cells of the Japanese quail. *Journal of reproduction and development*, 59(6), 580–587. DOI:10.1262/jrd.2013-065

- [3] Hamburger, V., & Hamilton, H. L. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Journal of morphology*, 88(1), 49–92. DOI:10.1002/jmor.1050880104
- [4] Naito, M., Nirasawa, K., & Oishi, T. (1990). Development in culture of the chick embryo from fertilized ovum to hatching. *Journal of experimental zoology*, 254(3), 322–326. DOI:10.1002/jez.1402540311
- [5] Tajima, A., Hayashi, H., Kamizumi, A., Ogura, J., Kuwana, T., & Chikamune, T. (1999). Study on the concentration of circulating primordial germ cells (cPGCs) in early chick embryos. *Journal of experimental zoology*, 284(7), 759–764. DOI:10.1002/(SICI)1097-010X(19991201)284:7<759::AID-JEZ5>3.0.CO;2-6
- [6] Bednarczyk, M. (2014). Avian primordial germ cells and their application. *Slovak journal of animal science*, 2014(4), 185–187.
- [7] Lillico, S. G., Sherman, A., McGrew, M. J., Robertson, C. D., Smith, J., Haslam, C., ... & Sang, H. M. (2007). Oviduct-specific expression of two therapeutic proteins in transgenic hens. *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of America*, 104(6), 1771–1776. DOI:10.1073/pnas.0610401104
- [8] Choi, J. W., Kim, S., Kim, T. M., Kim, Y. M., Seo, H. W., Park, T. S., ... & Han, J. Y. (2010). Basic fibroblast growth factor activates MEK/ERK cell signaling pathway and stimulates the proliferation of chicken primordial germ cells. *PLoS one*, 5(9), e12968. DOI:10.1371/journal.pone.0012968
- [9] Macdonald, J., Glover, J. D., Taylor, L., Sang, H. M., & McGrew, M. J. (2010). Characterisation and germline transmission of cultured avian primordial germ cells. *PLoS one*, 5(11), e15518. DOI:10.1371/journal.pone.0015518
- [10] Tang, X., Zhang, C., Jin, Y., Ge, C., & Wu, Y. (2007). Pro-proliferating effect of homologous somatic cells on chicken primordial germ cells. *Cell biology international*, 31(9), 1016–1021. DOI:10.1016/j.cellbi.2007.03.014
- [11] Shi, Y., & Massagué, J. (2003). Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*, 113(6), 685–700. DOI:10.1016/S0092-8674(03)00432-X
- [12] Lee, H. C., Lim, S., & Han, J. Y. (2016). Wnt/ β -catenin signaling pathway activation is required for proliferation of chicken primordial germ cells in vitro. *Scientific reports*, 6(1), 34510. DOI:10.1038/srep34510
- [13] Yakhkeshi, S., Rahimi, S., Sharafi, M., Hassani, S. N., Taleahmad, S., Shahverdi, A., & Baharvand, H. (2018). In vitro improvement of quail primordial germ cell expansion through activation of TGF-beta signaling pathway. *Journal of cellular biochemistry*, 119(6), 4309–4319. DOI:10.1002/jcb.26618
- [14] Hassani, S. N., Totonchi, M., Farrokhi, A., Taei, A., Larijani, M. R., Gourabi, H., & Baharvand, H. (2012). Simultaneous SUPPRESSION of TGF- β and ERK signaling contributes to the highly efficient and reproducible generation of mouse embryonic stem cells from previously considered refractory and non-permissive strains. *Stem cell reviews and reports*, 8(2), 472–481. DOI:10.1007/s12015-011-9306-y
- [15] Hassani, S. N., Totonchi, M., Gourabi, H., Schöler, H. R., & Baharvand, H. (2014). Signaling roadmap modulating naive and primed pluripotency. *Stem cells and development*, 23(3), 193–208. DOI:10.1089/scd.2013.0368
- [16] Van De Lavoie, M. C., Collarini, E. J., Leighton, P. A., Fesler, J., Lu, D. R., Harriman, W. D., ... & Etches, R. J. (2012). Interspecific germline transmission of cultured primordial germ cells. *PLoS one*, 7(5), e35664. DOI:10.1371/journal.pone.0035664
- [17] Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), E45. DOI:10.1093/nar/29.9.e45
- [18] Van De Lavoie, M. C., Diamond, J. H., Leighton, P. A., Mather-Love, C., Heyer, B. S., Bradshaw, R., ... & Etches, R. J. (2006). Germline transmission of genetically modified primordial germ cells. *Nature*, 441(7094), 766–769. DOI:10.1038/nature04831
- [19] Yao, T., & Asayama, Y. (2017). Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. *Reproductive medicine and biology*, 16(2), 99–117.
- [20] Pauklin, S., & Vallier, L. (2015). Activin/nodal signalling in stem cells. *Development (Cambridge)*, 142(4), 607–619. DOI:10.1242/dev.091769
- [21] Ying, Q. L., Nichols, J., Chambers, I., & Smith, A. (2003). BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell*, 115(3), 281–292. DOI:10.1016/S0092-8674(03)00847-X
- [22] Pain, B., Clark, M. E., Shen, M., Nakazawa, H., Sakurai, M., Samarut, J., & Etches, R. J. (1996). Long-term in vitro culture and characterisation of avian embryonic stem cells with multiple morphogenetic potentialities. *Development*, 122(8), 2339–2348. DOI:10.1242/dev.122.8.2339
- [23] Etches, R. J. (2006). The hard cell(s) of avian transgenesis. *Transgenic research*, 15(5), 521–526. DOI:10.1007/s11248-006-9018-2
- [24] Lin, S., & Talbot, P. (2011). Methods for culturing mouse and human embryonic stem cells. *Methods in molecular biology*, 690, 31–56. DOI:10.1007/978-1-60761-962-8_2
- [25] Park, T. S., & Han, J. Y. (2012). piggyBac transposition into primordial germ cells is an efficient tool for transgenesis in chickens. *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america*, 109(24), 9337–9341. DOI:10.1073/pnas.1203823109
- [26] Xie, L., Lu, Z., Chen, D., Yang, M., Liao, Y., Mao, W., ... & Lu, Y. (2019). Derivation of chicken primordial germ cells using an indirect Co-culture system. *Theriogenology*, 123, 83–89. DOI:10.1016/j.theriogenology.2018.09.017
- [27] Tonus, C., Cloquette, K., Ectors, F., Piret, J., Gillet, L., Antoine, N., ... & Grobet, L. (2016). Long term-cultured and cryopreserved primordial germ cells from various chicken breeds retain high proliferative potential and gonadal colonisation competency. *Reproduction, fertility and development*, 28(5), 628–639.

- [28] Intarapat, S., & Stern, C. D. (2013). Chick stem cells: Current progress and future prospects. *Stem cell research*, 11(3), 1378–1392. DOI:10.1016/j.scr.2013.09.005
- [29] Zou, Q., Wu, M., Zhong, L., Fan, Z., Zhang, B., Chen, Q., & Ma, F. (2016). Development of a xeno-free feeder-layer system from human umbilical cord mesenchymal stem cells for prolonged expansion of human induced pluripotent stem cells in culture. *PLoS one*, 11(2), e0149023. DOI:10.1371/journal.pone.0149023
- [30] Germeraad, W. T. V., Asami, N., Fujimoto, S., Mazda, O., & Katsura, Y. (1994). Efficient retrovirus-mediated gene transduction into murine hematopoietic stem cells and long-lasting expression using a transwell coculture system. *Blood*, 84(3), 780–788. DOI:10.1182/blood.v84.3.780.bloodjournal843780
- [31] Sip, C. G., Bhattacharjee, N., & Folch, A. (2014). Microfluidic transwell inserts for generation of tissue culture-friendly gradients in well plates. *Lab on a chip*, 14(2), 302–314.
- [32] England, M. A., & Matsumura, G. (1993). Primordial germ cells in the primitive streak stages chick embryo as studied by scanning electron microscopy. *Journal of anatomy*, 183, 67–73. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1259854&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- [33] Kuwana, T., Miyayama, Y., Kajiura, Y., & Fujimoto, T. (1987). Behavior of chick primordial germ cells moving toward gonadal primordium in vitro: Scanning electron microscopic study. *The anatomical record*, 219(2), 164–170. DOI:10.1002/ar.1092190209
- [34] Han, J. Y., & Park, Y. H. (2018). Primordial germ cell-mediated transgenesis and genome editing in birds. *Journal of animal science and biotechnology*, 9(1), 1–11. DOI:10.1186/s40104-018-0234-4
- [35] Vallier, L., Alexander, M., & Pedersen, R. A. (2005). Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells. *Journal of cell science*, 118(19), 4495–4509. DOI:10.1242/jcs.02553
- [36] Mullen, A. C., Orlando, D. A., Newman, J. J., Lovén, J., Kumar, R. M., Bilodeau, S., ... & Young, R. A. (2011). Master transcription factors determine cell-type-specific responses to TGF- β signaling. *Cell*, 147(3), 565–576. DOI:10.1016/j.cell.2011.08.050
- [37] Estarás, C., Akizu, N., García, A., Beltrán, S., de la Cruz, X., & Martínez-Balbás, M. A. (2012). Genome-wide analysis reveals that Smad3 and JMJD3 HDM co-activate the neural developmental program. *Development (Cambridge, England)*, 139(15), 2681–2691. DOI:10.1242/dev.078345
- [38] Bertero, A., Madrigal, P., Galli, A., Hubner, N. C., Moreno, I., & Burks, D. (2015). Activin/nodal signaling and NANOG orchestrate human embryonic stem cell fate decisions by controlling the H3K4me3 chromatin mark. *Genes & development*, 29(7), 702–717.
- [39] Ogawa, K., Saito, A., Matsui, H., Suzuki, H., Ohtsuka, S., Shimosato, D., ... & Miyazono, K. (2007). Activin-Nodal signaling is involved in propagation of mouse embryonic stem cells. *Journal of cell science*, 120(1), 55–65.
- [40] Borowiak, M., Mach, R., Chen, S., Chen, A. E., Tang, W., Fox, J. L., ... & Melton, D. A. (2009). Small molecules efficiently direct endodermal differentiation of mouse and human embryonic stem cells. *Cell stem cell*, 4(4), 348–358. DOI:10.1016/j.stem.2009.01.014

Journal of Applied Biology
Autumn 2023

Al-Zahra University - Vice Chancellery for Research

Director in charge: M.Seifali, Assistant Professor Of Alzahra University

Chief Editor: M. Soudi, Professor of Alzahra University

Director in charge: M.Seifali, Assistant Professor of Alzahra University

Associate Editor: P. Ghadam, Associate Professor of Alzahra University

Associate Editor: A. Abdi Ali, Associate Professor of Alzahra University

Editorial Boards

M. Aghdasi, Associate Professor of Golestan University

H. Ejtehadi, Professor of Ferdowsi University of Mashhad

N. Hosseinmardi, Associate Professor of Shahid Beheshti University of Medical Sciences

F. Darvishi, Professor of Alzahra University M. Seyyedi, Associate Professor of Tehran University

M. Ranjbar, Professor of Bu Ali Sina University

A. Saboora, Associate Professor of Alzahra University

A. Abdi Ali, Associate Professor of Alzahra University

P. Ghadam, Associate Professor of Alzahra University

Z. Minochehr, Associate Professor Genetic Research Center of Tehran University T.

Valinassabpouri, Research Professor of Iranian Fisheries Science Research Institute

International Editorial Board

H. Rajaei, Professor of Zoology Research Alexander Quinn Sh. Shahabi, Professor,
Research Director of Highland Pharmaceutical Company and Associate Professor of South
West Nechroathy Medical College Executive

Manager: Sh. Borjian

Publisher: Alzahra University - Vice Chancellery for Research

English& Persian Editor: Masoumeh Aslanzadeh,

Printing and Binding: Alzahra University Publishing

Circulation: 10 copies

Publication Frequency: Quarterly

Price: 10000 Rls

In order to have access to the table of Contents and abstracts contact: Address:

Alzahra University-Vice Chancellery for Research, Vanak Sq,

Tehran, 1993891176, Iran.

Tel/Fax:021- 85692205

Website: <http://journals.alzahra.ac.ir/jab>

ISSN: 1607- 9884

Email: Japplbiol@alzahra.ac.ir

1.Evaluation of *norB* gene expression in ciprofloxacin resistant *Staphylococcus aureus* strains

Salman Asadi Pirzadeh¹, Mehdi Ebrahimi^{2*}, Mohamad Ebrahimzadeh³

2.The response of *Polianthes tuberosa* L. to the use of some vitamins during growth and development.

Mehrdad Bababrabie¹, Hossein *Zarei²

3.Effect of blood of different vertebrates on reproductive parameters of *Hirudo orientalis*

Dariush Bozorgi, *Hossein Rahmani, Sohrab KohestanEskandari, Khosrow Jani Khalili

4.Molecular tracing of caviar obtained from sturgeon species to identify the original and species of sturgeon

Shirin Jamshidi¹, Mohammad Hasanzadeh Saber², Maryam Monsef Shokri³

5.Comparison of Traditional Morphological Methods and Geometric Morphometric Method

Applied to *Acanthopagrus* Peters, 1855 (Perciformes: Sparidae) in Persian Gulf and Oman Gulf

B. Dehghani¹, *F. Yazdani Moghaddam^{1,2}, M. Doustdar³, A. Hashemi⁴, E. Damadi¹

6.Comparison of diet composition of variable toad *Bufo* *sitibundus* (Amphibia: Anura:

Bufonidae), inside and outside the caves in west of Iran

***H. Darvishnia¹, A. Kavyanifard¹**

7.Evaluation of the effect of growth factor Activin A and small molecule IDE1 on proliferation and self-renewal of chicken primordial germ cells in vitro culture

Masumeh Zare¹, Seyed Ziaedin Mirhoseini^{1*}, Seyedeh-Nafiseh Hassani^{2*}, Shahrokh Ghovvati¹

8.Nano-titanium oxide and nano zinc oxide foliar application ameliorates the salinity stress effects on *Matricaria chamomilla*

Iraj Ezzatmand¹, *Lamia Vojodi Mehrabani², Ali Abdolzadehfard³

9.The effects of climate change on the distribution pattern and habitat suitability of the Azerbaijan lizard *Darevskia raddei raddei* (Boettger, 1892) (Lizards: Lacertidae)

Rasoul Karamiani*, ¹ Amir .Dehghani²

10.Investigating the effect of chemical substance concentration and 50% limit in drinking water on productive performance, egg quality and biochemical and hematological indicators of blood of laying hens

Hossein Nornia¹, *Reza Vakili², Saeed Sobhani Rad³, Mehdi Elahi Tarshizi⁴